



# Uso de ferramentas ecotoxicológicas na avaliação da qualidade da água: um caso de estudo na albufeira de Crestuma-Lever (Norte de Portugal)

Fernanda Krieger de Mello Bastian

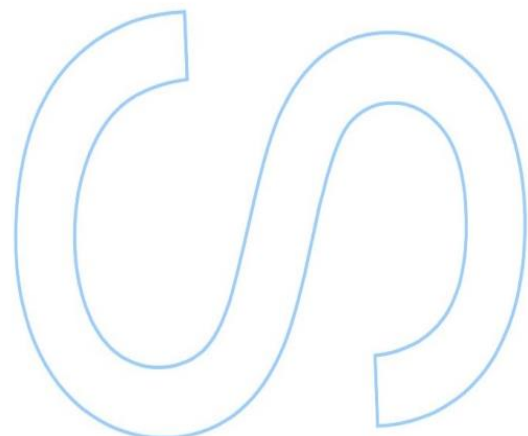
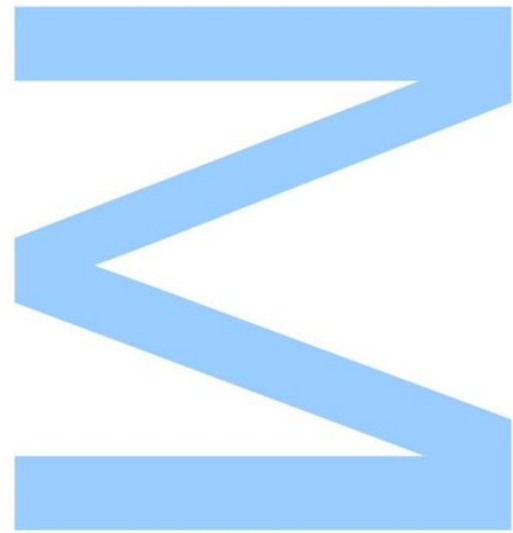
Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água  
Departamento de Biologia  
2013

## **Orientadora**

Doutora Sara Cristina Antunes, Professora Auxiliar Convidada,  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

## **Co-orientadora**

Doutora Maria da Natividade Vieira, Professora Associada com Agregação  
do Departamento de Biologia da FCUP

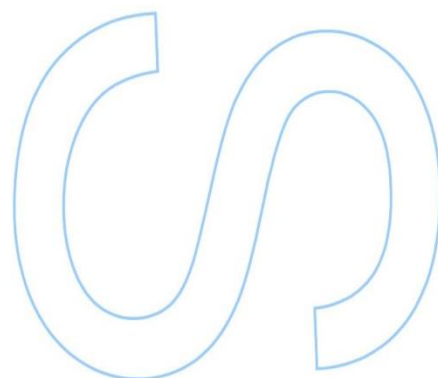
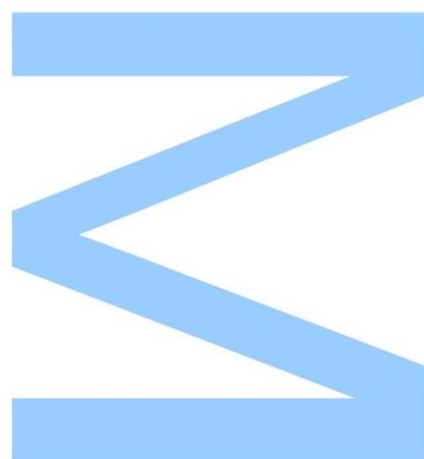




Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, para a obtenção do grau de mestre em Biologia e Gestão da Qualidade da Água, da responsabilidade do Departamento de Biologia.

A presente tese foi desenvolvida sob a orientação científica da Doutora Sara Cristina Antunes, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da FCUP; e co-orientação científica da Doutora Maria da Natividade Vieira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da FCUP.

# AGRADECIMENTOS

No país das gaivotas, inicio meus sinceros agradecimentos com uma passagem de Fernão Capelo Gaivota, cujo livro é de mesmo nome, de 1970:

*"Vocês querem voar tão alto, a ponto de perdoar o bando, aprender e voltar a eles, um dia, e trabalhar para ajudá-los a se conhecerem?"*

Pai e mãe, minha eterna gratidão, por tudo. Ensinaamentos, carinho, encorajamento, apoio psicológico, emocional e financeiro. Foi no seio da vossa criação que eu “criei” asas e é graças ao vosso encorajamento que eu migro com novos ventos. Pai, mãe, Dani e Gui obrigada pelo amor e força incondicionais. Sem esta estrutura, o caminho seria muito mais árduo.

À Professora Doutora Sara, pelo trabalho prático no laboratório, pelos “puxões de orelha”, por trazer-me de volta à Terra, quando muito divagava. Pela orientação, no real sentido da palavra, pelo ensino, por todo o percurso até aqui. De grande, enorme-valia. Muito obrigada!

E à Professora Doutora Natividade, por sempre transmitir-me calma desde o início, por entender as minhas dificuldades diante dos conteúdos abordados nas disciplinas do mestrado, por me ter ouvido em momentos difíceis e me ter conduzido à professora Dra. Sara.

À Doutora Sara e à Doutora Natividade, por estas simbolizarem, em minha trajetória, as duas gaivotas que instruem Fernão Capelo a alçar seu mais alto vôo.

Ao José Vivas, pelo pontapé inicial. Francisco Norberto Araújo, painho, por cuidar de mim em momentos de plena execução dos trabalhos do mestrado. Ao Michelin pelos diálogos sempre harmoniosos. À Anisa, pelo seu coração fraterno. À Chiara, pela amizade desde que cheguei no Porto. À Miriam Miranda, pela sua presença fundamental durante o mestrado, foste um anjo. À Clari, pela iniciativa em manter contato através de cartas! À Ló, Jói, Elisa, Tais, pela amizade e carinho, mesmo além-mar. Ao Fernando Vilarinho e Miguel (ICBAS), pelos incessantes empréstimos de livros. Ao Saimon Berthuline Gonzales, pelos ensinamentos, somente aqui pude entender muitas das coisas das quais me falava. Aos amigos Naia Lua, Vecchiato, Sina, Arcádio, Eslabão, Dona Goretti, Chalita, Cristina e Gervais. À Margarida, pelo companheirismo e amizade nesta última etapa. Ao Kostiantyn, pelas dicas de emprego, pela força, pela dica da ferramenta “ctrl + F”. À Nina e ao Pedro.

A todos os professores deste mestrado, pela transferência do conhecimento científico.

“Desde que estou aqui, passo o tempo andando, perambulando, pensando, pensando, e sinto o ânimo crescer dia a dia... E, agora, Kostia, já sei e compreendo que em nosso trabalho - tanto faz se actuamos no palco ou escrevemos - o importante não é a glória, nem o brilho ou a realização dos sonhos, e sim saber sofrer. Saber carregar a cruz e ter fé! **Eu tenho fé e não sinto tanta dor, e quando penso em minha profissão, já não temo a vida**” (Nina, A Gaivota, Anton Tchekov).

*“Se há suficiente autoridade para remover um charco putrido próximo de umas quantas habitações modestas, decerto que aos rios que percorrem tantos quilómetros não se poderá permitir que sejam transformados em esgotos em fermentação. Se descurarmos o assunto, não poderemos esperar que se faça em impunidade, nem devemos ficar surpreendidos se antes de decorridos muitos anos uma estação de tempo quente nos trazer a triste prova da nossa incúria” (Michael Faraday, 1855, em carta ao The Times).*

# RESUMO

A água, embora seja um recurso natural renovável, é um elemento limitado e insubstituível para as diferentes formas de vida. Neste sentido, a gestão ambiental integrada e a gestão dos recursos hídricos são indispensáveis para a proteção, controlo e monitorização do estado das massas de água. A barragem de Crestuma-Lever foi construída para fins energéticos, mas atualmente o seu uso é diverso (e.g. hidroenergia, água para consumo humano, irrigação, pesca, lazer e recreação). Dentre os problemas relacionados à construção de barragens ao longo dos cursos dos rios estão as profundas alterações que estes ecossistemas sofrem (e.g. variação do caudal, entrada excessiva de nutrientes, elevada turvação levando à redução da entrada de luz, depleção do oxigénio, e mais drasticamente a transição de um sistema lótico a sistema lêntico com alteração das comunidades). Estas alterações podem levar à deterioração da qualidade da água. Assim, a implementação legal dentro da Directiva Quadro da Água (DQA) veio minimizar a lacuna existente sobre o correto uso e gestão das massas de água. A DQA é uma política europeia de gestão da qualidade da água, em que o principal objetivo incide sobre a proteção, o melhoramento e a recuperação de todas as massas de águas superficiais e subterrâneas e garantir o seu bom estado ecológico até 2015. As albufeiras são classificadas pela DQA como massas de água fortemente modificadas, que estão vulneráveis a pressões antropogénicas. Na perspectiva de gestão ambiental, e de acordo com as premissas de avaliação da qualidade da água segundo a DQA, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a qualidade da coluna de água da albufeira de Crestuma-Lever, através da quantificação de parâmetros físicos e químicos gerais propostos pela DQA e através de ensaios ecotoxicológicos. Deste modo, foram recolhidas amostras de água e sedimentos em dois pontos distintos dentro da albufeira. Com as amostras recolhidas foram realizados ensaios de toxicidade aguda e crónica para a água e sedimento (através de elutriados) dos dois pontos de amostragem com o microcrustáceo *Daphnia magna* e a bactéria *Aliivibrio fischeri* (ensaio de Microtox®). Paralelamente, as águas foram caracterizadas através de alguns parâmetros físicos e químicos. Foi ainda quantificado o conteúdo em clorofila *a* das amostras de água de modo a classificar a massa de água de acordo com um dos elementos biológicos propostos pela DQA. Os dados obtidos pelos parâmetros físicos e químicos bem como o conteúdo em clorofila *a* permitiram classificar as águas recolhidas no ponto Crestuma-Lever em Potencial Ecológico Bom a Superior e a classificação de Razoável, Medíocre ou Mau para as águas do ponto de amostragem Marina. Os ensaios agudos e crónicos corroboraram os resultados obtidos pela “abordagem DQA”, não se tendo registado efeitos negativos para qualquer matriz da coluna de água avaliada. No entanto, nos elutriados realizados com sedimentos do ponto de amostragem Marina, observou-se a morte de alguns organismos, quando expostos a 100% do elutriado.

**Palavras-chave:** Gestão Ambiental, albufeiras, Directiva Quadro da Água, *Daphnia magna*, ensaios ecotoxicológicos, Microtox®, elutriados.

# ABSTRACT

The water, despite being a renewable natural resource, is also a limited and irreplaceable resource for different life forms. Therefore, the integrated environmental management is necessary to protect, control and monitor the state/conditions of aquatic environments. The dam Crestuma-Lever was built for energy supply but currently has many uses (e.g. hydropower, human water supply, agriculture, fishing, entertainment and recreation). Within the problems related to construction of dams along rivers are the extensive alterations and pressures observed in these ecosystems (e.g. variation of riverbed, excessive nutrient input, the increase of turbidity with the decrease of the light in the aquatic environment, a reduction in the oxygen, and more drastically the transition of lotic to lentic ecosystem, with communities alterations). These changes lead to a decrease in the water quality. Hence, the Water Framework Directive (WFD) plays an essential role in the reduction of the existent faults over the correct use and water quality management. WFD is the European Water Policy and its main goal is focused in protecting, increasing and recovering all surface and underground waters, in order to achieve a good ecological status until 2015. According to WFD, reservoirs are identified as strongly modified aquatic ecosystems, that are vulnerable to anthropogenic pressures. In integrated environmental management perspective, namely of aquatic resources, the present work aimed to assess the quality of the water column from Crestuma-Lever reservoir through the quantification of physical and chemical parameters proposed by WFD and through ecotoxicological assays. To attain this objective, water and sediments were collected in two sampling points in Crestuma-Lever reservoir. Acute and chronic assays with water and elutriates (extracted from sediments), from Crestuma-Lever reservoir, were conducted using the microcrustacean *Daphnia magna* and the bacteria *Aliivibrio fischeri* (Microtox<sup>®</sup> assay). Additionally, water samples were characterized in order to physical and chemical parameters and pigment content – chlorophyll *a*. The latter was used to classify the water bodies following WFD for biological parameter. The data obtained from physical and chemical analyses and content in chlorophyll *a* concluded that the collected water did not presented values of concern allowing the classification as good to high ecological status for the water of Crestuma-Lever and the classification of Moderate, Poor or Bad status for Marina's sampling point. Acute and chronic assays supported the obtained results using the “WFD approach”, without having registered negative effects for any natural water and elutriates evaluated. However, some toxicity was observed in elutriates from Marina sampling point since with a few mortality at 100% of elutriate.

**Keywords:** Environmental Management, dams, Water framework Directive, *Daphnia magna*, ecotoxicological assays, Microtox<sup>®</sup>, elutriates.

# Índice

	Pág.
1 Introdução	2
1.1 Gestão Ambiental	2
1.2 Gestão de Recursos Hídricos	5
1.3 Directiva Quadro da Água (DQA)	7
1.4 Indicadores ambientais	13
1.4.1 Ensaio Ecotoxicológicos	15
1.5 Objetivos	18
2 Materiais e Métodos	20
2.1 Local de Estudo – Albufeira de Crestuma-Lever	20
2.2 Recolha das Amostras	22
2.3 Caracterização das Amostras	23
2.4 Manutenção de cultura de <i>Daphnia magna</i>	24
2.5 Ensaio ecotoxicológicos	26
2.5.1 Preparação das amostras	27
2.5.1.1 Amostras de água	27
2.5.1.2 Obtenção dos elutriados	27
2.5.2 Ensaio Agudo	27
2.5.3 Ensaio Crónico	28
2.5.4 Microtox®	29
2.5.5 Análise Estatística	29
3. Resultados e Discussão	31
3.1 Parâmetros físicos e químicos	31
3.2 Ensaio Ecotoxicológicos	38
4 Considerações Finais	45
5 Referências Bibliográficas	48



# Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Relações entre os elementos de qualidade, elementos biológicos, hidromorfológicos e físico-químicos que interferem na classificação do Potencial Ecológico, segundo a DQA nas definições normativas do Anexo V, item 1.2.	10
Figura 2. Quadro DPSIR “ <i>driving forces, pressures, state, impact, response</i> ”	13
Figura 3. Evolução dos indicadores ambientais.	14
Figura 4. Neonato de <i>Daphnia magna</i> (escala 500µm) e <i>D.magna</i> idade adulta (escala 2mm)	17
Figura 5. Rio Douro a montante, em Espanha, e Douro à jusante, em Portugal.	20
Figura 6. Principais barragens no curso principal do rio Douro.	21
Figura 7. Vista Geral da Barragem e da albufeira de Crestuma-Lever	21
Figura 8. Resultados obtidos para os parâmetros referentes ao crescimento e reprodução de <i>D. magna</i> , nos ensaios crónicos, após exposição às águas naturais e aos elutriados - preparados a partir dos sedimentos recolhidos nos dois pontos de amostragem: Crestuma-Lever e Marina.	42

# Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1. Objetos de gestão e seus respectivos exemplos; tipos de gestão aplicáveis para cada objeto de gestão e resultados esperados.	4
Tabela 2. Relações de causa e consequência, decorrentes de processos naturais e ações antropogénicas.	4
Tabela 3. Elementos de qualidade biológica para a avaliação do potencial ecológico para a categoria Lagos e Albufeiras.	11
Tabela 4. Parâmetros Físico-Químicos gerais a monitorizar em massas de água fortemente modificadas – albufeiras; limite máximo determinado para alguns parâmetros, para o estabelecimento do Bom Potencial Ecológico.	11
Tabela 5. Elementos hidromorfológicos de suporte e respectivas componentes e indicadores a utilizar na avaliação do Potencial Ecológico.	12
Tabela 6. Tabela resumo dos métodos utilizados para a quantificação dos parâmetros físicos, químicos e biológicos gerais propostos pela DQA, nas amostras de água.	23
Tabela 7. Composição química do meio de cultura sintético ASTM “ <i>hard water</i> ”.	25
Tabela 8. Composição química do extracto de alga <i>Ascophyllum nodosum</i> e as quantidades relativas na forma de pó seco.	26
Tabela 9. Tabela resumo dos parâmetros físicos e químicos medidos <i>in situ</i> e em laboratório, nas águas dos dois pontos de amostragem (Crestuma-Lever e Marina).	32
Tabela 10. Normalização dos RQEs.	37
Tabela 11. Tabela resumo dos cálculos do RQE e classificação do Potencial Ecológico para o fitoplâncton, para os dois locais de amostragem.	37
Tabela 12. Tabela resumo da análise de variâncias de uma via aplicada aos parâmetros quantificados nos ensaios crónicos com <i>D. magna</i> exposta às águas naturais e aos elutriados (g.l. - graus de liberdade; QM – quadrados médio; <i>F</i> - <i>F</i> estatístico (QMfactor/QMresidual), <i>P</i> - probabilidade). Os valores a negrito evidenciam os parâmetros para os quais se registam diferenças significativas.	43

# Lista de Abreviaturas

ANOVA	Do acrónimo em inglês: <i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
APA	Agência Portuguesa do Ambiente
A.P.H.A	Da sigla em inglês: <i>American Public Health Association</i>
ASTM	Da sigla em inglês: <i>American Society for Testing and Materials</i>
CBO <sub>5</sub>	Carência Bioquímica de Oxigénio, após 5 dias.
DPSIR	Do acrónimo em inglês: <i>driving forces, pressures, state, impact, response</i>
DQA	Directiva Quadro da Água
EC <sub>50</sub>	Do acrónimo em inglês: <i>Effective Concentration for 50% of organisms</i> (Concentração Efetiva para 50% dos organismos)
EEA	Da sigla em inglês: <i>European Environment Agency</i>
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
FAO	Da sigla em inglês: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
IGA	Índice do Grupo de Algas
INAG	Instituto Nacional da Água
ISO	Da sigla em inglês: <i>International Organization for Standardization</i>
LC <sub>50</sub>	Do acrónimo em inglês: <i>Lethal Concentration for 50% of organisms</i> (Concentração Letal para 50% dos organismos)
LOEC	Do acrónimo em inglês: <i>Lowest Observed Effects Concentration</i> (Menor concentração com efeitos observáveis)
MIEB	Laboratório de Tecnologias Ambientais
NOEC	Do acrónimo em inglês: <i>Non Observed Effect Concentration</i> (Concentração sem efeitos observáveis)
NQA	Normas de Qualidade Ambiental
OCDE	Organização para a Cooperação para o Desenvolvimento Económico
PEM	Potencial Ecológico Máximo
RPM	Rotações por minuto
RQE	Rácio de Qualidade Ecológica
SNIRH	Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos
USEPA	Da sigla em inglês: <i>United States Environment Protection Agency</i>
WHO	Da sigla em inglês: <i>World Health Organization</i>

## ***Introdução***

# 1 Introdução

## 1.1 Gestão Ambiental

Atualmente, a gestão ambiental e a avaliação dos ecossistemas é largamente explorada devido ao ritmo intensivo do desenvolvimento tecnológico e do crescimento populacional mundial. Neste sentido, a gestão ambiental surgiu como uma área de intervenção, baseada numa visão holística, para a elaboração e aplicação de normas e instrumentos norteadores, na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos e dos ecossistemas naturais (Oliveira, 2005).

O aumento intensivo de ações antropogénicas tem resultado na degradação dos recursos naturais disponíveis, causando efeitos deletérios na fauna, flora bem como na saúde humana, por vezes, irreversíveis. Assim, entende-se que de acordo com a realidade ambiental atual é necessário proceder a uma intervenção interdisciplinar de modo a avaliar, mitigar e recuperar os ecossistemas alterados com conhecimentos de ação o mais correto possível. Reconhecida esta realidade, alguns autores mencionam a importância da constituição de grupos de profissionais de diversas áreas, uma vez que abordam os problemas ambientais e as inter-ligações nos ecossistemas de formas diferentes (grupos multidisciplinares transversais) (Oliveira, 2005; Basso e Verdum, 2006), para avaliar os impactos no ambiente. Deste modo, equipas transversais serão uma mais-valia na identificação de efeitos nefastos no ecossistema; e também, na forma de ação, de mitigação e solução de problemas existentes. Estas alterações, essencialmente resultantes de ações antropogénicas, podem ser registadas ao nível da escala temporal (milhares, centenas, dezenas de anos) ou da escala espacial (a nível local, regional, nacional, global) (Oliveira, 2005).

Conforme Aguirre (2002), atualmente verificam-se diferentes tendências e opiniões acerca da utilização dos recursos naturais renováveis e não renováveis. É possível destacar as correntes favoráveis à conservação dos recursos no seu estado natural, de maneira a excluir toda a forma de intervenção antrópica. Por outro lado, há também quem defenda a ideia de que a conservação deve ser feita em virtude das necessidades do mercado e do crescimento económico. Por fim, existem os defensores das correntes de pensamento e de ação que procuram encontrar práticas produtivas equilibradas, as quais permitam aliar o desenvolvimento económico à gestão adequada da natureza. Esta última abordagem da utilização pensada dos recursos naturais enquadra-se num dos objetivos da gestão ambiental. A partir destes princípios, é possível perceber a importância progressiva que o gestor ambiental tem vindo a obter uma vez

que depende dele gerir, sensibilizar, monitorizar. Por outro lado, o gestor ambiental tem as competências de poder intervir em organizações, instituições, indústrias e governos de modo a sensibilizar para práticas ambientalmente responsáveis ou menos danosas (Raymond *et al.*, 2010) para os ecossistemas, as quais podem exercer influências diretas ou indiretas na saúde e bem-estar do Homem e na qualidade dos ecossistemas naturais (Stokols, 1992).

As tendências anteriormente referidas, ou seja, as abordagens de avaliação dos impactos sobre os ecossistemas (avaliação de risco) apresentam dois objetivos gerais: serem de carácter preventivo, as quais deverão ser avaliadas com base no princípio da precaução, cujo objetivo é evitar possíveis perturbações no ambiente, resultantes de produtos e/ou de actividades antropogénicas (Cameron e Abouchar, 1991) ou serem de carácter retrospectivo ou mitigador, o qual recorre a medidas paliativas, previstas no princípio da correção, com estratégias de minimizar o impacto de alguma situação de degradação, atuando prioritariamente na fonte dos danos causados ao meio ambiente (Oliveira, 2005). Todavia, em alguns casos, o princípio da correção é aplicado tarde demais ou de forma ineficiente (Oliveira, 2005), resultando em prejuízos irreversíveis sobre o meio ambiente (e.g. redução ou a perda da biodiversidade) (Antunes *et al.*, 2003; Goulart e Callisto, 2003).

Oliveira (2005), na sua obra, explora os objetos de gestão que ocorrem atualmente (ver Tabela 1). O mesmo autor propõe, ainda, os tipos de gestão adequados para cada objeto de gestão apresentado e os possíveis resultados esperados para cada um deles (Tabela 1).

**Uso de ferramentas ecotoxicológicas na avaliação da qualidade da água: um caso de estudo na albufeira de Crestuma-Lever (Norte de Portugal)**

Tabela 1. Tabela resumo dos objetos de gestão e respectivos exemplos, tipos de gestão aplicáveis para cada objeto de gestão e resultados esperados. (*adaptado de: Oliveira, 2005*).

<b>OBJETOS DE GESTÃO</b>			
	Sistema Alterado pelo Homem	Sistema Produtivo Antropogénico	Implementação e Exploração de Serviços
Exemplos	Transvases, construção de barragens e de lagos artificiais, zonas de reserva natural, florestas, etc.	Siderúrgicas, indústrias de alimentos, plano de aproveitamento hidráulico, etc.	Fornecimento de energia, transportes e/ou controlo da qualidade de vida de um centro urbano.
Tipo de Gestão Adequada	Primar por baixos investimentos e visar o máximo de benefícios, sem interferir na qualidade dos recursos naturais.	Máxima produtividade e o mínimo desperdício de matéria-prima. Otimizar fatores produtivos e de operação.	Garantir um serviço mais cómodo, flexível e seguro aos utentes com a menor intervenção sobre os ecossistemas.
Resultados esperados	Alcançar o equilíbrio entre o sistema alterado e a sua envolvente ecológica.	Minimizar os impactos resultantes destas actividades.	Garantir a eficácia dos serviços.

Para os impactos resultantes de ações antropogénicas, Oliveira (2005) refere que estas alterações são indutoras de efeitos ambientais concretos, os quais se podem manifestar através de modificações na ecosfera, tornando-se uma realidade vasta e complexa. Deste modo, diferentes processos naturais e determinadas ações antropogénicas podem resultar em consequências muito distintas nos ecossistemas (Tabela 2).

Tabela 2. Relações de causa e consequência, decorrentes de processos naturais e ações antropogénicas. (*adaptado de: Oliveira, 2005*).

<b>CAUSA - processo/ação</b>	<b>CONSEQUÊNCIA - Possível Efeito</b>
Erosão	Alteração nas características e na composição do solo, da água e do biota
Agricultura	Polição difusa de compostos orgânicos e de nutrientes através da escorrência dos solos para os ecossistemas aquáticos
Processos de destruição de sistemas ambientais raros e/ou únicos	Perda - muitas vezes irreversível- de elementos dos ecossistemas ao nível do equilíbrio biológico (perda da biodiversidade)
Sobreutilização de sistemas produtivos essenciais necessariamente limitados	Redução da qualidade do ecossistema
Utilização descontrolada de recursos naturais não renováveis ou localmente escassos	Esgotamento de recursos não renováveis. Degradação dos recursos localmente escassos, limitando a capacidade de recarga e/ou autodepuração

Neste sentido, adotemos como exemplo de objeto de gestão a construção de barragens, as quais resultam em profundas alterações nas características hidromorfológicas, físicas, químicas e biológicas de um rio (APA, 2012).

As barragens são construções que se tornam serviços de utilidade pública e de interesse geral (Decreto-Lei n.º 97/2008/CE). Os serviços que estas construções fornecem

à sociedade são inúmeros e até ao momento as barragens são reconhecidas como essenciais para suprir as necessidades dos centros urbanos e rurais a vários níveis (e.g. a produção de energia elétrica, o abastecimento para consumo humano ou industrial, a irrigação, pesca, navegação, o controlo de cheias, reservas de água, actividades de lazer e recreio (Abreu, 2006)). No entanto, a magnitude das pressões que estes sistemas exercem sobre os ecossistemas aquáticos naturais (rios) é enorme, que se revela essencial e necessária uma adequada gestão.

## 1.2 Gestão dos Recursos Hídricos

A água, embora seja um recurso natural renovável, é um elemento limitado e insubstituível para as diferentes formas de vida existentes no planeta (Ball, 1999). Deste modo, é premente proteger os recursos hídricos uma vez que, por um lado, a água é essencial para a sobrevivência das espécies e, por outro, assegura os serviços de provisão, regulação, de cultura e suporte dos ecossistemas (Tebbutt, 1998; Travassos, 2013).

No que se refere ao correto uso e gestão de recursos hídricos, Postel (2000) indica que um número significativo de tecnologias e práticas de gestão estão disponíveis para reduzir substancialmente a quantidade de uso da água na agricultura, na indústria, no uso doméstico (e.g. irrigação por gotejamento realizada nos Kibutz de Israel (Postel, 1992) e a utilização de águas residuais recicladas (Watkinson *et al.*, 2007)). No entanto, as regras e as políticas que orientam as decisões relacionadas com o uso da água não são aplicadas adequadamente, apresentando lacunas administrativas e de monitorização. O crescimento da população e a rápida globalização são factores que influenciam e reflectem a crescente procura pela água, existindo, deste modo, uma pressão antropogénica excessiva sobre os recursos hídricos naturais.

Embora o fluxo natural dos recursos hídricos, nomeadamente dos rios, desempenhe um papel essencial na sustentação da biodiversidade natural e na integridade dos ecossistemas aquáticos, estudos demonstram que cerca de 60% dos rios encontram-se fragmentados (Poff *et al.*, 1997; Tharme, 2003).

As barragens são construídas pelo Homem e resultam na fragmentação dos rios. A transição de um ecossistema lótico para um ecossistema lêntico resulta em modificações no regime hidrológico, em alterações no transporte e acúmulo de sedimentos (Hart e Poff, 2002), em mudanças na biogeoquímica de nutrientes e substâncias tóxicas, no armazenamento e metabolismo do carbono no ecossistema, na perda de espécies nativas e expansão de espécies invasoras e doenças emergentes



(Carpenter *et al.*, 2011), que acabam por comprometer a qualidade da água. Mas, uma vez que a exploração de recursos hídricos envolve diferentes sectores da sociedade, o Decreto-Lei nº344/2007 determina que as barragens “são necessárias para que se faça uma adequada gestão das águas”. No entanto e além das alterações anteriormente mencionadas, um dos principais problemas que envolvem a gestão dos recursos hídricos, e neste caso específico as barragens, está em encontrar o equilíbrio entre a água que fica retida a montante (na albufeira) e a que é libertada para a jusante (caudal do rio) das barragens (Abreu, 2006), gerando, a partir disso, diversos impactos ambientais. Como refere Abreu (2006), estes impactos podem ser de várias ordens:

- Impactos de 1ª ordem: efeitos abióticos que se traduzem em alterações físicas, químicas e geomorfológicas e ocorrem ao mesmo tempo em que a barragem entra em actividade (e.g. redução nos caudais dos rios, aumento da turbidez);
- Impactos de 2ª ordem: derivam do efeito dos primeiros, afectam os elementos bióticos (taxa de produtividade primária, fontes de matéria orgânica, vegetação ripária e das comunidades de macrófitas e perifíton) e abióticos dos ecossistemas (e.g. estrutura dos habitats, depleção dos níveis de oxigénio dissolvido na água);
- Impactos de 3ª ordem: alterações bióticas sobre as comunidades piscícolas, de aves, mamíferos aquáticos e que resultam dos efeitos dos dois primeiros impactos.

De acordo com o referido, verifica-se que estes impactos geram um ecossistema aquático que apresenta novas condições ambientais, com características diferentes das inicialmente encontradas. Assim, as albufeiras adquirem um carácter de vulnerabilidade estrutural e ecológica frente a perturbações (naturais ou antropogénicas), uma vez que a capacidade de depuração natural destes ecossistemas é reduzida comparativamente com a dos rios (Ferreira *et al.*, 2009).

Em função destas massas de água fortemente modificadas apresentarem grande importância política, económica, social e ecológica, as albufeiras têm atraído a atenção de autarcas, especialistas e investigadores relativamente ao seu uso e à monitorização da qualidade da água existente nestes “novos” ecossistemas.

Segundo Wetzel (1983) as albufeiras tendem a ser pouco profundas atingindo, na maioria dos casos, cerca de 20 m de profundidade. É devido a característica morfométrica que as águas de lagos e albufeiras ficam expostas aos processos químicos e metabólicos, pela continuidade física que têm com os solos e sedimentos. Além disto, a

entrada de nutrientes nestes ecossistemas por processos de lixiviação provenientes dos terrenos circundantes são factores importantes de controlo para a sua qualidade da água. A qualidade da água nas albufeiras está associada às características físicas, químicas e biológicas. Está associada também à qualidade do sedimento que ocorre no fundo, devido às interações deste com a coluna de água. Como refere Brils (2008), os sedimentos consistem numa “parte essencial, integral e dinâmica das bacias hidrográficas” em que, por um lado, refletem o estado qualitativo de um sistema aquático e, por outro, também actuam como depósitos para muitas das substâncias químicas poluentes.

O sedimento é considerado o reservatório de resíduos, em virtude da capacidade de este absorver metais e compostos químicos (e.g., poluentes organofílicos, hidrofóbicos) e de os acumular. No entanto, a problemática ambiental incide sobre a possibilidade da transferência destes compostos para a coluna de água e, assim, entrarem na cadeia alimentar aquática (Pereira *et al.*, 2009). Um outro problema associado ao sedimento está relacionado com o facto de os sedimentos ficarem acumulados no fundo das albufeiras, requerendo frequentemente a sua remoção. Estas remoções são normalmente feitas através de dragagens. As dragagens provocam a libertação de nutrientes e outras substâncias possivelmente agregadas às partículas dos sedimentos para a coluna de água. Por outro lado, também podem reduzir a capacidade de suporte e regulação natural das albufeiras, quando o volume de água nestes reservatórios está reduzido ou quando se verifica a sobrecarga de efluentes orgânicos enriquecidos com azoto e fósforo para o interior dos corpos hídricos. Por essa razão, alguns autores referem que a entrada excessiva de nutrientes, de matéria orgânica e/ou de material sólido (Casado, 2008) pode levar a desequilíbrios nos ecossistemas aquáticos, tal como os processos de eutrofização, de modo a prejudicar todo o sistema biótico.

O processo de eutrofização é caracterizado pelo enriquecimento dos sistemas aquáticos por nutrientes (nomeadamente azoto e fósforo). O excesso de nutrientes nos ecossistemas aquáticos leva ao aumento da produtividade primária, podendo ocorrer florações de algas (“*blooms*” algais), por vezes tóxicas (Reynolds, 1992; WHO, 2005). Florações de cianobactérias foram já observadas em todo o mundo e podem frequentemente produzir e liberar toxinas (Vasconcelos *et al.*, 2006) prejudiciais e, em alguns casos, até mesmo fatais para os restantes níveis da cadeia trófica.

### 1.3 Directiva Quadro da Água (DQA)

No que respeita à Política da Água, em 2000, a Comunidade Europeia elaborou a Directiva 2000/60/CE, comumente conhecida como Directiva Quadro da Água (DQA). Esta diretiva tem como principal objetivo incumbir todos os Estados-Membros a proteção, o melhoramento e a recuperação de todas as massas de água superficiais até 2015. Portugal, sendo um dos Estados-Membro incluídos nesta diretiva (DQA), transpôs para direito interno a respectiva lei, a qual foi publicamente nomeada Lei da Água (Lei nº58/2005, de 29 de Dezembro) e complementada pelo Decreto-Lei nº77/2006, de 30 de Março (que dispõem da lista de substâncias poluentes, de diferentes diretivas elaboradas para a monitorização e o controlo da qualidade das massas de água abrangidas pela Lei da Água, da disposição de valores limites de emissão e normas de qualidade ambiental (NQA), entre outros) e Decreto-Lei nº97/2008, de 11 de Junho (que determina o *regime económico e financeiro dos recursos hídricos*, e.g. o princípio do poluidor-pagador). As referidas DQA e Lei da Água contemplam a gestão de diferentes categorias de massas de água: águas de superfície, especialmente as águas interiores, de transição e costeiras e as águas subterrâneas e, para cada uma, estabelece a proteção e as condições de referência da qualidade ecológica (Tempesta e Vecchiato, 2013). A DQA contempla não somente os recursos hídricos supracitados, como as águas, leitos e margens desses recursos hídricos, como também, as zonas adjacentes, zonas de infiltração máxima e zonas protegidas (Lei nº58/2005, Lei da Água).

A Lei da Água (2005), no seu artigo 1º, determina: evitar a deterioração e proteger os ecossistemas aquáticos; promover uma utilização sustentável; proteger o ambiente aquático através da redução gradual, cessação ou eliminação de descargas; e assegurar a boa qualidade no fornecimento das águas superficiais e subterrâneas. De modo a garantir todos estes pressupostos, foram elaborados alguns princípios dos quais se destaca o princípio do poluidor-pagador, sustentado pelo Decreto-Lei nº97/2008/CE, que consiste em determinar valores mínimos para a quantidade de poluentes (e.g. azoto, fósforo e matéria oxidável) contidos na descarga de efluentes para os recursos hídricos. Por outro lado, existem mais dois princípios a destacar: o da precaução e o da prevenção. O primeiro incide na adopção de medidas que evitem os impactos negativos advindos de ações sobre o ambiente, ainda que estes não apresentem suporte científico corroborativo e o segundo, por sua vez, assenta na necessidade de eliminar de uma forma antecipada as ações que levam a efeitos negativos no ambiente.

Relativamente aos planos de ordenamento do território (nacionais), planos de recursos hídricos (gestão de bacias hidrográficas) e as medidas de proteção e

valorização dos recursos hídricos (planos específicos de gestão das águas), independentemente do âmbito de abrangência, estes visam fixar as normas de qualidade ambiental e os critérios relativos ao estado das massas de água e, portanto, são instrumentos que orientam para o seguimento dos princípios supracitados.

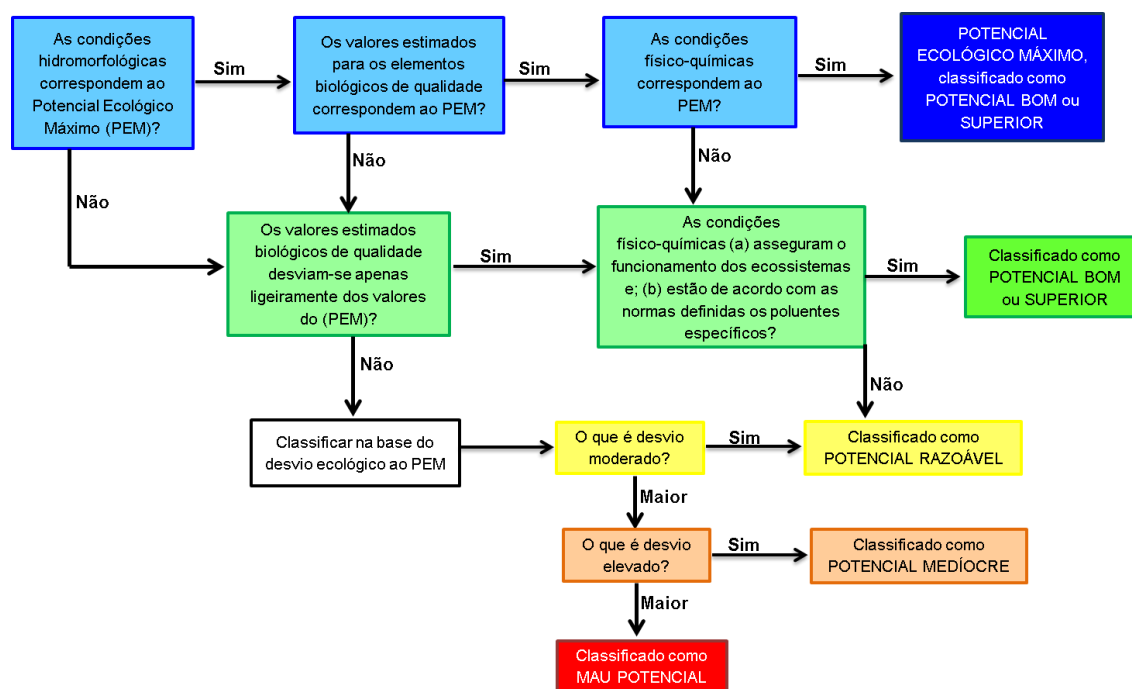
Os planos de ordenamento de albufeiras, por exemplo, têm de ser elaborados com o principal “objetivo de proteção e valorização dos recursos hídricos” (INAG, 2009). As albufeiras, como é o caso da albufeira de Crestuma-Lever, segundo Ferreira *et al.* (2009), *são massas de águas lénticas permanentes e artificiais*, construídas principalmente para atender às necessidades antropogénicas: abastecimento, rega, hidroenergia, lazer. Nestes ecossistemas aquáticos, as comunidades biológicas ficam sujeitas às variações hídricas (volume e nível da água, padrões de variabilidade), às actividades humanas desenvolvidas na albufeira (e.g. recreio) e à bacia de drenagem correspondente. Este tipo de ecossistema aquático enquadra-se na tipologia “fortemente modificada”, pelo que adquirem um carácter substancialmente diferente, em virtude das alterações físicas resultantes da intervenção humana (Lei nº58/2005).

Assim, e de acordo com o objetivo da DQA, as massas de águas fortemente modificadas devem alcançar um BOM POTENCIAL ECOLÓGICO, isto é, *o estado em que as comunidades biológicas apresentam uma estrutura ecológica sem desequilíbrios populacionais ou outros, em harmonia com o ambiente físico e químico que as suporta, com uma exploração adequada e interactiva dos vários habitats aquáticos e garantindo a existência de processos e funções ecológicas meta-estáveis* (Ferreira *et al.*, 2009) e um BOM ESTADO QUÍMICO, ou seja, *o estado químico alcançado por uma massa de água superficial em que as concentrações de poluentes cumprem as normas de qualidade ambiental definidas em legislação específica* (Lei nº58/2005, Lei da Água, art.4º), até ao período de tempo estipulado. De acordo INAG (2009a), o Potencial Ecológico consiste *no desvio que a qualidade da massa de água apresenta relativamente ao máximo que pode atingir (Potencial Ecológico Máximo- PEM)*. E o Bom Potencial Ecológico equivale à *qualidade ecológica na qual se verificam ligeiras alterações dos elementos de qualidade* propostos pela DQA a serem avaliados *em relação aos valores próprios do PEM* (INAG, 2009) (ver Figura 1).

Os elementos de qualidade – a partir dos quais é feita a classificação do Potencial Ecológico - propostos na DQA a serem avaliados nas albufeiras são: físicos e químicos, biológicos e hidromorfológicos de suporte. Assim, e de acordo com os resultados obtidos em cada elemento avaliado, a massa de água poderá ser classificada num Potencial Ecológico Excelente, Bom ou Superior, Razoável, Medíocre ou Mau. A título

exemplificativo, e uma vez que cada elemento de classificação tem um resultado, o Potencial Ecológico de uma massa de água será classificado com base no elemento que apresentou o pior resultado.

No que respeita ao estado químico das águas, este consiste em reflectir a presença de substâncias químicas nos ecossistemas aquáticos, que em condições naturais não existiriam ou estariam em valores residuais. As substâncias químicas podem apresentar características como persistência, toxicidade e bioacumulação e são susceptíveis de causar efeitos nefastos no ambiente aquático (INAG, 2009). Neste sentido, para avaliar a presença e concentrações de algumas substâncias identificadas como prioritárias, a Directiva 105/2008/CE, de 16 de Dezembro, enumera uma lista de substâncias a quantificar de modo a serem aplicadas as normas de qualidade ambiental (NQA). Relativamente aos poluentes específicos, o INAG (2009) disponibiliza a lista com as substâncias que devem ser controladas e os respectivos valores máximos admitidos para cada uma delas, para o aferimento do bom estado.



**Figura 1.** Representação esquemática das relações entre os elementos de qualidade biológica, físico-químicos e hidromorfológicos de suporte utilizados para a classificação do Potencial Ecológico das massas de águas artificiais ou fortemente modificadas (Fonte: INAG, 2009), onde PEM = Potencial Ecológico Máximo.

Após a apresentação dos resultados da 1ª Fase do Exercício de Intecalibração (Decisão da Comissão 915/2008/CE), e nomeadamente para as albufeiras, foi proposto que para a avaliação do Potencial Ecológico, o elemento biológico a avaliar é o fitoplâncton e seus respectivos indicadores (Tabela 3).

**Uso de ferramentas ecotoxicológicas na avaliação da qualidade da água: um caso de estudo na albufeira de Crestuma-Lever (Norte de Portugal)**

Tabela 3. Elementos de qualidade biológica para a avaliação do potencial ecológico para a categoria Lagos e Albufeiras (Fonte: INAG, 2009).

ELEMENTO BIOLÓGICO	COMPONENTE	INDICADOR
Invertebrados Bentónicos	Composição e abundância	
Fauna Pscícola	Composição, abundância e estrutura etária	
Fitoplâncton	Composição, abundância e biomassa	Índice do Grupo de Algas (IGA) Biovolume de Cianobactérias (%) Concentração de Clorofila <i>a</i> (mg/m <sup>3</sup> ) Biovolume Total (mm <sup>3</sup> /L)
Outra Flora Aquática	Composição e abundância	

Os parâmetros físicos e químicos e hidromorfológicos de suporte utilizados na avaliação da qualidade da água de albufeiras estão apresentados nas Tabelas 4 e 5 (INAG, 2009).

Tabela 4. Parâmetros Físico-Químicos gerais a monitorizar em massas de água fortemente modificadas – albufeiras - e o limite máximo determinado para alguns parâmetros, para o estabelecimento do Potencial Ecológico Bom (Fonte: INAG, 2009).

ELEMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS GERAIS	PARÂMETROS	UNIDADES	LIMITE PARA O BOM PE (NORTE)
	Profundidade Disco de Secchi	M	-
Condições de Transparência	Sólidos Suspensos Totais	mg/L	-
	Cor	escala Pt-Co	-
	Turbidez	NTU	-
			-
Condições Térmicas	Perfil de temperatura	0°C	-
	Perfil de Oxigénio Dissolvido <sup>(1)</sup>	mg O <sub>2</sub> /L	≥ 5mg O <sub>2</sub> /L
Condições de Oxigenação	Perfil de Taxa de Saturação em Oxigénio <sup>(1)</sup>	% saturação de O <sub>2</sub>	Entre 60 e 120%
	Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO <sub>5</sub> )	mg O <sub>2</sub> /L	-
	Carência Química em Oxigénio (CQO)	mg O <sub>2</sub> /L	-
Salinidade	Condutividade Eléctrica a 20°C (média)	µS/cm	-
	pH <sup>(1)</sup>	Escala de Sorensen	Entre 6 e 9*
Estado de Acidificação	Alcalinidade	mg HCO <sub>3</sub> /L	-
	Dureza	mg CaCO <sub>3</sub> /L	-
	Nitratos <sup>(2)</sup>	mg NO <sub>3</sub> /L	≤25mg NO <sub>3</sub> /L
	Nitritos	mg NO <sub>2</sub> /L	-
Condições relativas a Nutrientes	Azoto Amoniacal	mg NH <sub>4</sub> /L	-
	Azoto Total	mg N/L	-
	Ortofosfato	mg PO <sub>4</sub> /L	-
	Fósforo Total <sup>(2)</sup>	mg P/L	≤0,05 mg P/L

(1) – 80% das amostras se a frequência for mensal ou superior.

(2) – Média anual.

\*Os limites indicados podem ser ultrapassados caso ocorram naturalmente.

Tabela 5. Elementos hidromorfológicos de suporte e respectivas componentes e indicadores a utilizar na avaliação do Potencial Ecológico (Fonte: INAG, 2009).

ELEMENTOS HIDROMORFOLÓGICOS	COMPONENTE	INDICADOR
Regime Hidrológico	Caudais e Condições de Escoamento	Afluências, caudal captado, turbinado, descarregado (ex.: reservados ecológicos); Nível da água
	Tempo de Residência	Tempo de residência
	Ligação a Massas Subterrâneas	-
Condições Morfológicas	Variação da Profundidade	-
	Quantidade, estrutura e substrato do leito	-
	Estrutura das margens	-

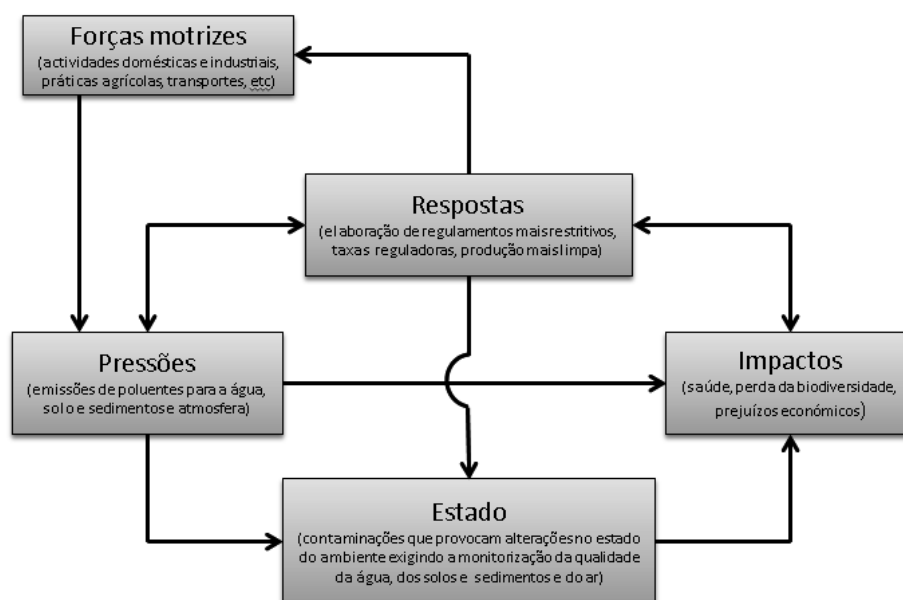
Com base na Lei da Água (Lei nº58/2005, alínea “ii”, item 1.4.1, Anexo V), os resultados dos elementos biológicos devem ser expressos em Rácios de Qualidade Ecológica (RQE) de modo a “assegurar a comparabilidade dos sistemas de classificação”. O RQE “configura a relação dos valores observados para um determinado parâmetro biológico numa determinada massa de água e o valor deste parâmetro na condição de referência para o tipo de massa de água em questão”. De realçar que o valor zero representa uma situação de grave degradação e o valor 1 representa uma situação de massa de água considerada referência. Reconhecidas algumas lacunas existentes relativamente aos elementos de avaliação ecológica, após a implementação da DQA e da Lei da Água, para Portugal, diversos estudos foram conduzidos na tentativa de estabelecer técnicas de modelação como instrumentos de investigação e predição de resultados em diferentes cenários, com a finalidade de cumprir com as metas estabelecidas pelas leis supracitadas (proteção, melhoramento e recuperação dos todos os ecossistemas aquáticos europeus até 2015) (Brils, 2008; Cabecinha *et al.*, 2009c).

Dos parâmetros que a DQA propõe, os sedimentos não são identificados como elementos para análise. Brils (2008) no seu trabalho de avaliação do sedimento dentro da DQA demonstra a importância do sedimento no equilíbrio do ecossistema aquático e como este foi negligenciado na avaliação da qualidade de água de um ecossistema aquático. Na DQA apenas se verifica a existência de cláusulas com reduzida ênfase sobre os sedimentos (e.g. “avaliação da concentração de substâncias prioritárias nas águas de superfície, sedimentos ou biota”). No entanto, reconhece-se que este compartimento do ecossistema aquático é componente essencial e integrante dos recursos hídricos, podendo interferir directamente na qualidade da água (Brils, 2008). A Lei da Água, por sua vez, relativamente aos sedimentos apenas aborda a questão do planeamento e da utilização regularizada de recursos hídricos em áreas de confinamento,

com vista a proteger os ecossistemas aquáticos e os recursos sedimentológicos (artigo 14º, da Lei nº58/2005, Lei da Água).

## 1.4 Indicadores ambientais

Os indicadores ambientais são elementos que reflectem as condições do ambiente permitindo-nos monitorizar, prevenir e controlar o estado de um ecossistema, quando se verificam pressões exercidas sobre o mesmo. Após reconhecidas estas premissas sobre um bom indicador ambiental tem havido uma elevada utilização destes elementos, na avaliação e conhecimento sobre os ecossistemas (Oliveira, 2005). Os indicadores ambientais surgiram a partir das observações entre as relações ambientais e os impactos antropogénicos sobre os ecossistemas. As reflexões acerca desta relação recaem sobre: a causa ambiental, o efeito e a resposta, desenvolvida pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE). Esta relação levou à criação do quadro DPSIR - *driving forces, pressures, state, impact, response* (Figura 2), que tem como objetivo simplificar e condensar esta informação (FAO, 1999; Oliveira, 2005) e por outro lado fornecer uma visão sobre o processo ambiental e as relações entre as actividades humanas e os impactos sobre o meio ambiente (e.g. bacias hidrográficas) (Brils, 2008).



**Figura 2.** Quadro DPSIR (Adaptado de: EEA, 1999; FAO, 1999; Oliveira, 2005; Brils, 2008).

Para a *European Environment Agency* - EEA, os indicadores ambientais são elementos que fornecem informações acerca dos fenómenos considerados típicos ou



críticos da qualidade ambiental (EEA – Technical Report N°25, 1999). E, com base no conceito elaborado pela EEA, Oliveira (2005) descreve que:

*“a principal função dos indicadores é a comunicação, ou seja, a troca de informações ligando o local a factores de carácter relevante, como, por exemplo, o teor em oxigénio da água, o qual reflecte o nível de poluição da mesma, variando com a temperatura ambiente e fornecendo indicações quanto às suas características de suporte biótico e de uso para fins tão diversos como a potabilidade ou o uso para fins aquícolas.”*

Atualmente, existe uma grande diversidade de indicadores ambientais (físicos, químicos e biológicos) que são utilizados em processos de monitorização e avaliação (EEA, 1999). Relativamente aos biológicos devemos realçar os organismos sensíveis a perturbações (Mazzia *et al.*, 2011). A Figura 3 apresenta um esquema simplificado da evolução faseada dos indicadores ambientais e o seu grau de complexidade, bem como, as possíveis respostas ambientais, relacionando o ecossistema aquático e a legislação em vigor.

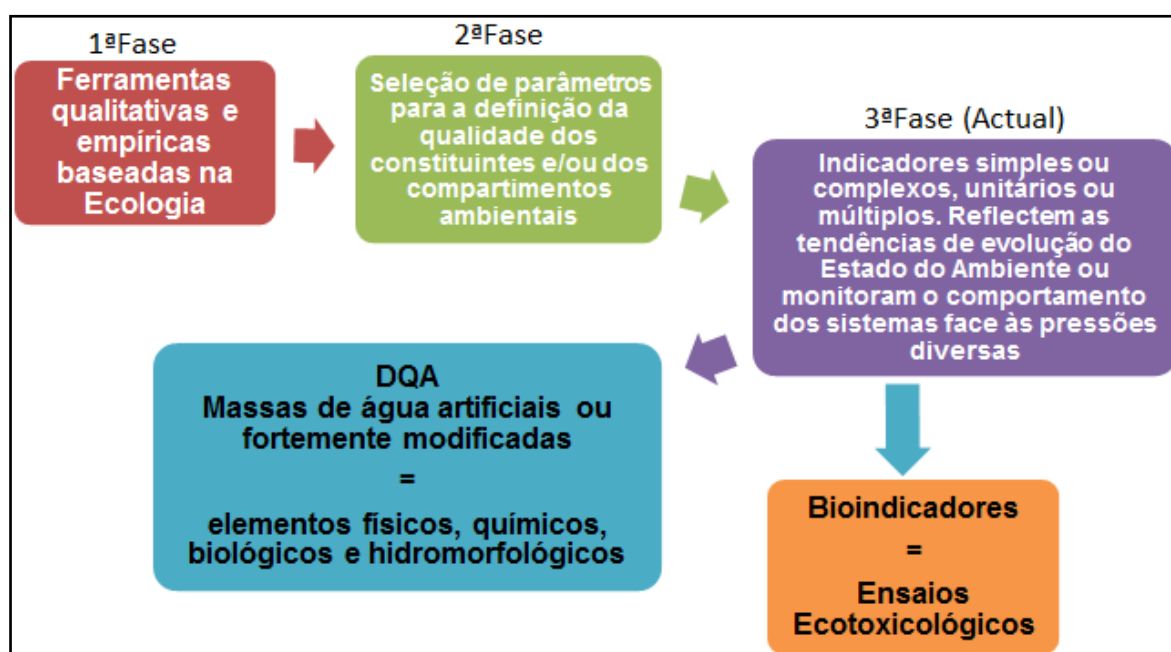


Figura 3. Evolução dos indicadores ambientais (Fonte: Adaptado de Oliveira, 2005).

Jorgensen (2000) menciona que o problema ambiental deve ser entendido e quantificado para se encontrar a solução mais adequada. Ou seja, a diversidade de situações e actores envolvidos somados às características próprias e únicas de cada sistema em questão exigirão o emprego de diferentes tipos gestão e diferentes indicadores ambientais. Por exemplo, note-se para o controlo da qualidade da água para consumo humano, é obrigatória a análise para a verificação de presença/ausência de

organismos patogénicos microbiológicos (e.g. parasita *Cryptosporidium*) (Tibbetts, 2000). A DQA, para avaliação do estado ecológico de massas de água superficiais recorre a diferentes grupos de organismos (peixes, invertebrados, macrófitas e fitoplâncton) individuais ou combinados (Cabecinha *et al.*, 2009a). Em rios, os macroinvertebrados bentónicos são largamente utilizados como indicadores de qualidade ambiental (Beyene *et al.*, 2009; Cabecinha *et al.*, 2009b). Ferreira *et al.* (2009), no seu estudo, propõe a utilização de macroinvertebrados bentónicos como indicadores ambientais para a avaliação de perturbações nas albufeiras de Portugal, além da avaliação de elementos biológicos como o fitoplâncton e elementos físico-químicos e hidromorfológicos de suporte, propostos pela DQA (INAG, 2009).

#### **1.4.1 Ensaios Ecotoxicológicos**

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos de substâncias sobre os organismos de um ecossistema (Manahan, 2013). Os bioensaios aparecem como indicadores ambientais amplamente utilizados em projetos de biomonitorização e avaliação de impactos antropogénicos. Os testes ecotoxicológicos ou bioensaios são ferramentas de avaliação biológica (Semaan *et al.*, 2001) que envolvem a exposição de organismos vivos a condições adversas ao seu bom desenvolvimento, e em que são avaliados os efeitos que ocorrem após a exposição.

Em ecotoxicologia, existe grande diversidade de testes/ensaios que têm sido utilizados por investigadores, laboratórios ambientais entre outras entidades para a avaliação do impacto que diferentes substâncias lançadas nos ecossistemas podem causar sobre organismos e comunidades naturais. Efluentes de explorações mineiras, efluentes de fábricas de papel e azeite, (Poston *et al.*, 1983; Semaan *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2009; Justino *et al.*, 2009; Chen, 2012) são exemplos de águas residuais que constituem-se de complexas misturas como metais pesados, compostos orgânicos persistentes, xenobióticos em geral, potencialmente nefastos para os organismos aquáticos. Outro exemplo são os contaminantes que podem estar associados às partículas dos sedimentos. A extração desses contaminantes por agitação mecânica – dando origem ao elutriado - é uma metodologia utilizada em ecotoxicologia para avaliação indirecta da toxicidade dos sedimentos. A agitação mecânica à qual o sedimento é submetido liberta contaminantes (os que não estão conjugados) para a coluna de água (Geffard *et al.*, 2002). Este procedimento de análise indirecta dos sedimentos é utilizado em estudos de monitorização e avaliação de contaminação, uma vez que poderá ser

visto como um simulador dos efeitos de uma dragagem (USEPA, 1998) em lagos e albufeiras.

Assim, os resultados de ensaios ecotoxicológicos desempenham um importante papel na regulação da entrada de novas substâncias no ambiente e na regulação de descargas de efluentes (Semaan *et al.*, 2001) para os ecossistemas aquáticos e na monitorização de locais historicamente contaminados.

Nesta perspectiva, a ecotoxicologia utiliza sempre organismos padrão que sejam representativos dos diferentes níveis tróficos: bactérias (e.g. teste de Microtox<sup>®</sup>), algas (fitoplâncton), microcrustáceos (zooplâncton), peixes (ictiofauna), (Regulamento n°793/93/CEE; Castillo *et al.*, 2000). Os parâmetros avaliados nos ensaios ecotoxicológicos devem também ser integradores e avaliadores a diferentes níveis biológicos: desde alterações ao nível do DNA celular até à comunidade (Cairns, 1992; Blaise, 1991; Castillo *et al.*, 2000).

De referir que aqui serão explorados apenas os ensaios agudos e crónicos com o cladóceros *Daphnia magna* e o teste de Microtox<sup>®</sup>, com a bactéria *Aliivibrio fischeri*, uma vez que foram apenas estes os testes conduzidos no presente caso de estudo. Além disso, caracterizam-se por serem testes simples e rápidos em que os organismos expostos respondem significativamente a impactos antropogénicos (Geffard *et al.*, 2002).

Segundo Johnson (2005), e com base na ideia de Bulich (1979), o ensaio de Microtox<sup>®</sup> é um “método simples e rápido para a monitorização da toxicidade de amostras de água”. O ensaio de Microtox<sup>®</sup> é um ensaio de avaliação de toxicidade aguda em que as amostras são incubadas juntamente com uma bactéria (*Aliivibrio fischeri*). O parâmetro avaliado é a redução de bioluminescência dessa bactéria após exposição à substância a analisar. Este ensaio trata-se de um teste de avaliação de toxicidade rápido, com o tempo de exposição de 5, 15 e 30 minutos (Tortora *et al.*, 2006).

*Daphnia magna* é o organismo de excelência em ecotoxicologia aquática (Figura 4), pertence ao filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca e subordem Cladocera (Flohr *et al.*, 2005). *D. magna* é um microcrustáceo filtrador, integrante do zooplâncton, comumente chamado de pulga da água (Wetzel, 1983). Este organismo padrão apresenta algumas vantagens na sua utilização em ensaios ecotoxicológicos, nomeadamente por possuir um ciclo de vida curto, por reproduzir-se assexuadamente por partenogénese (redução da variabilidade genética), ter um grande número de indivíduos por ninhada e ser um organismo facilmente cultivado em laboratório (Martinez-Madrid *et al.*, 1999; Semaan *et al.*, 2001). Para além destas vantagens vários autores já demonstraram que *D. magna* apresenta elevada

sensibilidade a muitas substâncias (Bridges *et al.*, 1996; Martinez-Madrid *et al.*, 1999) potencialmente deletérias, como xenobióticos e outros poluentes.

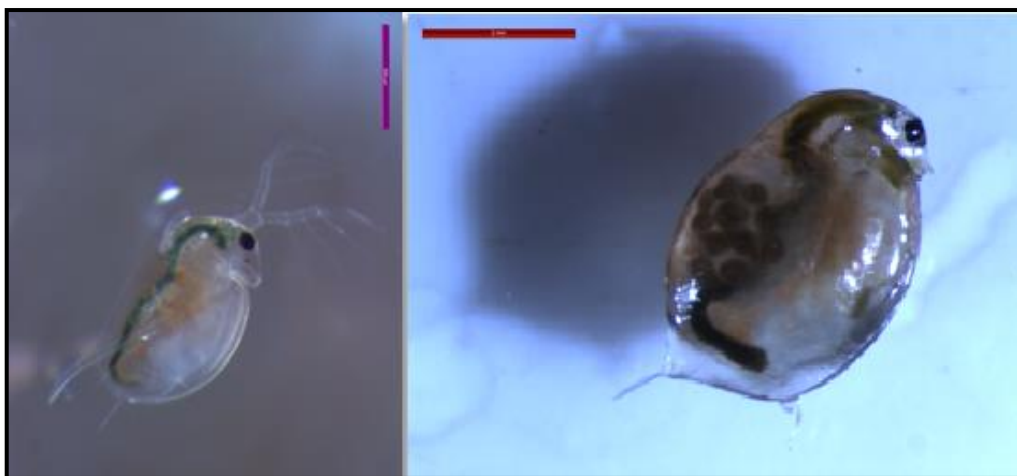


Figura 4. Neonato de *Daphnia magna* (escala 500µm) e *D. magna* adulta (escala 2mm) (Fotografia: Fernanda Bastian).

Os ensaios ecotoxicológicos padronizados com *D. magna* compreendem duas abordagens diferentes de acordo com o tempo de exposição e o parâmetro a avaliar, denominados de ensaio agudo e ensaio crónico. O ensaio agudo ou teste de imobilização, o parâmetro a avaliar é a morte ou imobilização após 48h de exposição ao agente stressante, e a informação gerada é a determinação da concentração efetiva da substância teste em que 50% dos indivíduos expostos são afectados (determinação do EC<sub>50</sub>) OCDE (2004). O objetivo do ensaio crónico, de acordo com o protocolo OCDE (1998), é determinar o efeito da substância teste sobre a história de vida de *Daphnia magna* (e.g. total de ninhadas produzidas, taxa de crescimento somático, número total de neonatos produzidos, taxa de incremento populacional). No final de um ensaio crónico (21 dias) será possível determinar o NOEC (concentração mais alta testada onde não foram observados efeitos) e o LOEC (concentração mais baixa testada na qual foram observados efeitos) (Adelman *et al.*, 2009) do agente de stresse avaliado.

## 1.5 Objetivos

De acordo com o enquadramento teórico apresentado, o objetivo da presente tese foi avaliar a qualidade da água da albufeira de Crestuma-Lever, situada a Norte de Portugal, no âmbito da gestão ambiental integrada e na gestão de recursos hídricos através da Directiva Quadro da Água. Assim, e de modo a responder a este objetivo geral, foram definidos vários objetivos específicos:

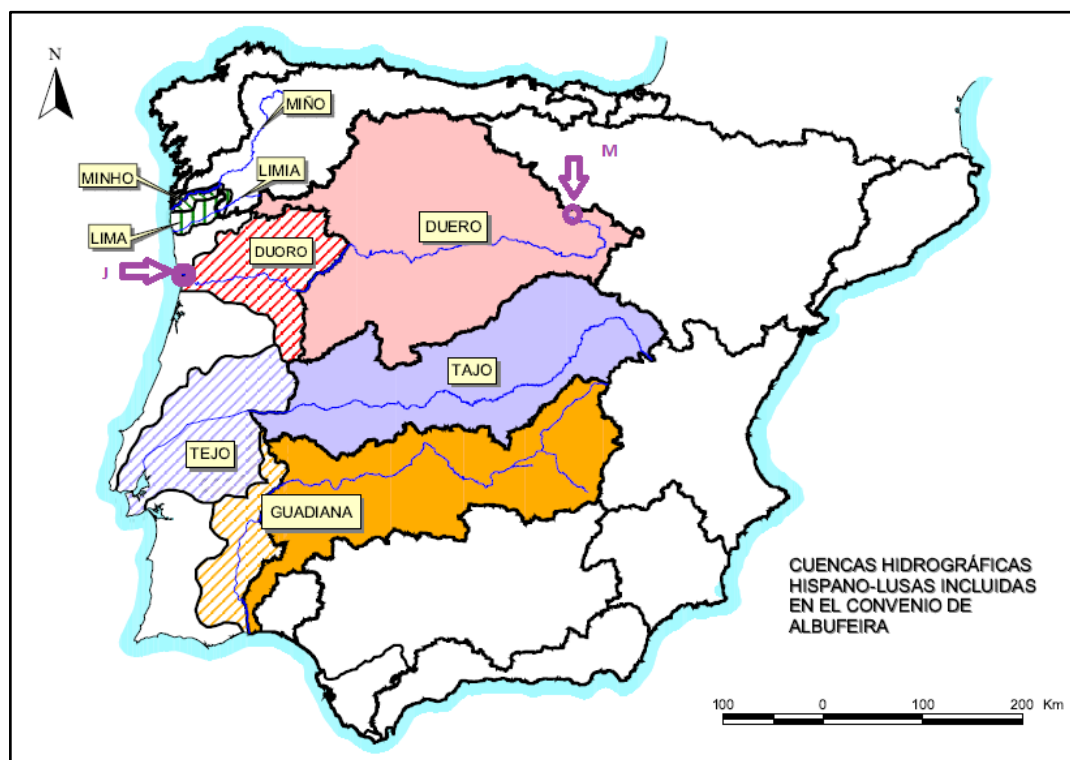
- Avaliar a qualidade da água da albufeira de Crestuma-Lever através de parâmetros físicos e químicos e biológicos, propostos pela Directiva Quadro da Água;
- Avaliar a toxicidade da água e de sedimentos da albufeira de Crestuma-Lever, através de ensaios padrão com *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri*;
- Interpretar os resultados obtidos nos parâmetros físico-químicos, de nutrientes e biológicos com os valores estabelecidos pela Directiva Quadro da Água (DQA), para este tipo de massa de água;
- Relacionar os dados obtidos no objetivo anterior com os resultados dos ensaios ecotoxicológicos padrão.

## ***Materiais e Métodos***

## 2 Materiais e Métodos

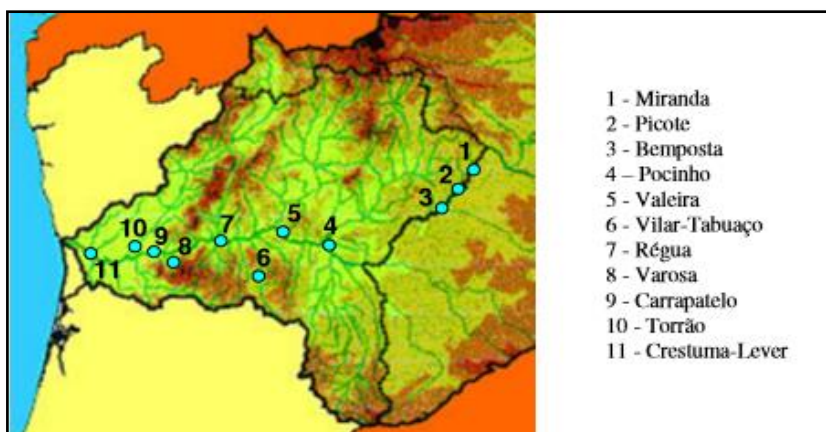
### 2.1 Local de Estudo – Albufeira de Crestuma-Lever

A Bacia Hidrográfica do Douro é a maior da Península Ibérica (Azevedo *et al.*, 2005). Possui uma área total de 97603 km<sup>2</sup> (INAG, 2004) e uma área inundável de 500,49 km<sup>2</sup>. O rio Douro é o principal curso de água presente nesta bacia hidrográfica. Nasce em Espanha, na Serra do Urbión e desagua no Oceano Atlântico no Porto (Portugal). Ao longo de seu curso principal, atravessa 21 concelhos portugueses e atinge o comprimento de 927 km (Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos Júnior, <http://snirh.pt/junior/?menu=2.1&item=4>) (Figura 5).



**Figura 5.** Rio Douro a montante, em Espanha, e Douro à jusante, em Portugal. Fonte: [http://www.magrama.gob.es/imagenes/en/0904712280006032\\_tcm11-27695.pdf](http://www.magrama.gob.es/imagenes/en/0904712280006032_tcm11-27695.pdf)

Em Portugal, o rio Douro foi seccionado por barragens aproximadamente a cada 30 km, dando origem a cerca de 10 albufeiras (Azevedo *et al.*, 2005). Dentre as principais barragens destacam-se: Miranda do Douro, Picote, Bemposta, Pocinho, Valeira, Vilar-Tabuaço, Régua, Varosa, Carrapatêlo, Torrão e, por fim, Crestuma-Lever (Leitão, 2005) (Figura 6).



**Figura 6.** Principais barragens no curso principal do rio Douro. Fonte: Leitão (2005).



**Figura 7.** Vista Geral da Barragem e da albufeira de Crestuma-Lever (Fonte: [http://www.wikienergia.pt/~edp/index.php?title=Imagem:CCL\\_VistaGerall.jpg](http://www.wikienergia.pt/~edp/index.php?title=Imagem:CCL_VistaGerall.jpg)).

De acordo com Leitão (2005), na barragem de Crestuma-Lever o esquema de concepção técnica funciona com base em gravidade de betão – isto é, barragem de concreto cuja estrutura é feita a partir de aglomerado artificial de pedras, cascalho e areia unidos por meio de um ligante hidráulico, com descarregadores de cheia sobre a própria barragem. E, embora tenha sido construída principalmente em função do seu potencial hidroenergético, esta tem um regime de exploração, armazenamento e fornecimento de água para fins múltiplos (Leitão, 2005) (Figura 7).

A barragem de Crestuma Lever é de fundo móvel; sua altura, acima da fundação, atinge os 65 m e uma de suas características é a presença de corredores construídos para a migração/passagem de peixes, com o intuito de evitar maiores impactos na ictiofauna deste ecossistema, embora tenha sido verificada a ineficácia do dispositivo de



transposição ou eclusa Borland para as espécies piscícolas tais como o sável, a enguia e a lampréia (APA, 2012).

A cota do nível em pleno armazenamento na albufeira de Crestuma-Lever é de 13,2 m, no entanto, a superfície inundável é de apenas 1298 ha (INAG, 2004). A barragem e a albufeira de Crestuma-Lever encontram-se situadas no Distrito do Porto, no Concelho de Gondomar, mais precisamente na freguesia de Foz do Sousa.

À albufeira é dada especial notoriedade uma vez que atende a múltiplos fins (Leitão, 2005), sendo essencial tanto para o desenvolvimento industrial e tecnológico como para o suprimento de água potável quer a nível urbano ou rural. Deste modo, destacam-se os principais tipos de aproveitamento atribuídos a esta massa de água fortemente modificada (INAG, 2005), como sendo: a geração de energia, o abastecimento de água a nível urbano e industrial e a navegação. Segundo Leitão (2005), atualmente esta albufeira encontra-se a ser explorada para fins de geração de energia hidroelétrica pela empresa EDP- Gestão da Produção de Energia, mas, também, principalmente para o abastecimento de água à área metropolitana do Porto, sendo a entidade gestora Águas do Douro e Paiva S.A. responsável pelo abastecimento de água potável a 20% da população portuguesa (Azevedo *et al.*, 2005).

## 2.2 Recolha de Amostras

Na albufeira de Crestuma-Lever foram escolhidos dois pontos de amostragem para a realização do presente trabalho. O primeiro ponto de amostragem localiza-se na margem direita da albufeira, em frente a Estação e Tratamento de Águas Residuais (ETAR) de Crestuma-Lever (Latitude 41°04'38,2" Norte e Longitude 8°28'20" Oeste). O segundo ponto de colheita foi efetuado num pequeno braço da albufeira que alberga uma marina de barcos, Marina Angra do Douro (Latitude 41°04'44" Norte e Longitude 8°27'57,5" Oeste) (coordenadas geográficas obtidas em campo, com a sonda multiparâmetros).

Em cada local de amostragem foram recolhidas amostras de água e sedimento. Para a recolha, armazenamento e transporte das amostras de água foram utilizadas garrafas de politereftalado de etileno (PET) de 1,5 L. Para a colheita do sedimento, os recipientes utilizados foram frascos de plástico - polietileno. Após a recolha, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas fechadas e transportadas para o laboratório, onde foram processadas e/ou armazenadas de acordo com os objetivos definidos. Uma pequena alíquota de sedimento e água de cada local de amostragem foi recolhida para pequenos frascos de vidro, os quais foram transportados para o laboratório em mala

térmica e imediatamente armazenados a -20°C para posterior realização do ensaio ecotoxicológico Microtox®.

Adicionalmente, foram medidos *in situ* parâmetros físicos e químicos com o auxílio de sonda paramétrica calibrada WTW Multiline P4 – Universal Meter (pH, condutividade eléctrica, sólidos dissolvidos totais, oxigénio dissolvido - expresso em mg/L e % e temperatura). Além disso, registou-se, em cada local, dados relativos às condições climatéricas e à transparência (através de Disco de Secchi) e profundidade, influenciadas também pela condição de turvação da água.

## 2.3 Caracterização das amostras

No laboratório, as amostras de água dos dois locais foram imediatamente analisadas, em triplicado segundo protocolos padronizados (Tabela 6). Os parâmetros quantificados foram os seguintes: amónia, nitritos, nitratos, fosfatos, dureza, alcalinidade, CBO<sub>5</sub>, turbidez, carbono orgânico dissolvido – COD, conteúdo em clorofila *a*. A quantificação dos nutrientes foi realizada com um espectrofotómetro de bancada modelo C200 - Hanna Instruments.

As restantes amostras de água e sedimento foram armazenadas a 4°C, no escuro, para a posterior realização de ensaios com *Daphnia magna*.

Tabela 6. Tabela resumo dos métodos utilizados para a quantificação dos parâmetros físicos, químicos e biológicos gerais propostos pela DQA, nas amostras de água.

Parâmetro	Princípio do método	Referência
Amónia (mg/L NH <sub>4</sub> -N)	A amónia pode ter origem nos materiais vegetais presentes e em decomposição ou, ainda, em águas profundas, por ação da redução microbiana dos nitratos ou em solos que apresentem ferro, induzindo ao processo de oxidação-redução. Em grandes quantidades, torna-se um nutriente limitante da produção primária. A sua determinação possibilita a caracterização funcional dos sistemas lênticos.	(Mendes e Oliveira, 2004)
Nitritos (mg/L NO <sub>2</sub> -N)	Forma de N dada através do produto da oxidação do azoto amoniacal ou da redução dos nitratos. De origem biológica (redução microbiana dos nitratos) ou química (oxidação do amoníaco procedente de processos de desinfecção das águas por cloraminas em temperaturas elevadas). Em grandes quantidades torna-se um nutriente limitante da produção primária. Sua determinação possibilita a caracterização funcional dos sistemas lênticos.	(Mendes e Oliveira, 2004)
Nitratos (mg/L NO <sub>3</sub> -N)	Os nitratos são um dos constituintes azotados de maior importância, necessário para a formação da biomassa vegetal e animal. Entretanto, em grandes quantidades torna-se um poluente com efeitos deletérios sobre a saúde humana e um nutriente limitante da produção primária nos ecossistemas aquáticos. Sua determinação possibilita a caracterização funcional dos sistemas lênticos.	(Mendes e Oliveira, 2004)
(Orto)Fosfatos (mg/L PO <sub>4</sub> -P)	O fósforo é um elemento essencial para o desenvolvimento de organismos vegetais e animais. Por outro lado, quando em grandes quantidades, torna-se um nutriente limitante da produção primária. É, em combinação com os nitratos, um dos principais responsáveis pelos <i>blooms</i> de algas. Sua determinação, assim como para os parâmetros acima, possibilita a caracterização funcional dos sistemas lênticos.	(Mendes e Oliveira, 2004)
Dureza (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Reflete a presença de sais de metais (ferro, alumínio), de metais alcalino-terrosos (cálcio, magnésio), principalmente em função da composição geológica em que se encontra o sistema dulçaquícola. A água dura pode tornar-se um inconveniente para seus consumidores e/ou utilizadores. Aniões tais como os carbonatos, bicarbonatos como também nitratos,	(Mendes e Oliveira, 2004)

	sulfatos, cloretos devem ser levados em conta aquando da análise da dureza da água.	
Alcalinidade (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Medida da sua capacidade de neutralização de ácidos.	(Mendes e Oliveira, 2004)
CBO <sub>5</sub> (mg/L)	Consiste na mensuração do OD passados 5 dias após a encubação da amostra em frasco completamente cheio e rolhado, mantido em ambiente escuro, a 20°C. O cálculo da massa de O <sub>2</sub> exprime a CBO <sub>5</sub> .	MIEB (2007 - 2008)
Turbidez (mg)	Propriedade óptica da água resultante da presença de sólidos suspensos (material orgânico particulado, argila, plâncton) e substâncias químicas dissolvidas na água.	A.P.H.A. (1992)
COD (mg/L)	A fração de carbono orgânico dissolvido na água atenua a entrada de radiação solar nos sistemas aquáticos dulçaquícolas e altera a disponibilidade de metais e nutrientes inorgânicos devido às interações que ocorrem entre estes. É indicador do estado de um sistema aquático e da evolução deste sistema frente a perturbações.	A.P.H.A. (1992)
Clorofila a	As clorofilas foram extraídas com acetona a 90% após filtração de um volume certo (250 mL) de água proveniente de cada ponto de amostragem. O conteúdo em clorofila a foi obtido através da equação monocromática de Lorenzen (1967). Este parâmetro permite fazer uma estimativa aproximada da biomassa algal e da produtividade primária dos ecossistemas aquáticos.	A.P.H.A. (1992)

## 2.4 Manutenção da cultura de *Daphnia magna*

O organismo-teste utilizado para a realização dos ensaios ecotoxicológicos agudos (OCDE, 2004) e crónicos (OCDE, 1998) foi o microcrustáceo *Daphnia magna*. A cultura de *Daphnia magna* foi mantida em laboratório ao longo de várias gerações, de acordo com os protocolos padronizados supramencionados sob condições controladas de fotoperíodo 16h<sup>L</sup>:8h<sup>E</sup> e temperatura 20 ± 2°C. O meio de cultura utilizado para a manutenção de *Daphnia* foi o meio sintético ASTM “*hard water*” (1980).

O meio de cultura ASTM foi preparado em água desionizada de acordo com o indicado na Tabela 7. As soluções *stock* dos compostos químicos foram efetuadas em água desionizada e armazenadas a 4°C. O meio ASTM “*hard water*” foi mantido à temperatura ambiente.

Tabela 7. Composição química do meio de cultura sintético ASTM “hard water” (1980).

Fórmula Química	Quantidade de composto para solução stock (g/L)	Quantidade de composto para 2L de solução concentrada (g)	Volume de solução concentrada para 20L de meio de cultura (mL)
NaHCO <sub>3</sub>	19,2	38,4	200
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	24,57	49,14	200
KCl	0,8	1,6	200
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O <sup>(*)</sup>	2,4	preparar no momento	
Tiamina HCl (B <sub>1</sub> )	0,150/100mL	1mL da mistura de vitaminas previamente preparada e armazenada a -20°C	
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	0,002/100mL		
Biotina (H)	0,0015/100mL		
pH = 7,8 ± 0,2			

(\*) feita no momento de preparação do meio ASTM: dissolver 2,4g de CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O em ≈ 1,5L de H<sub>2</sub>O desionizada num matraz mantido sob agitação contínua até que soluto e solução atinjam a sua completa mistura.

A alimentação das culturas de *Daphnia magna* foi efetuada com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* numa concentração de 3,0x10<sup>5</sup> cel/mL/dia. A cultura de *P. subcapitata* foi cultivada em laboratório em culturas mantidas com o meio Woods Hole MBL (Stein, 1973), sob condições controladas (temperatura 20±2°C e fotoperíodo 16h<sup>L</sup>: 8h<sup>E</sup>) (Antunes *et al.*, 2004). Além disto, foi adicionado às culturas um aditivo orgânico. Este aditivo é constituído por um extracto da alga *Ascophyllum nodosum* (Baird *et al.*, 1989). O extracto de alga foi preparado a partir de uma solução concentrada de extracto (Tabela 8), na qual foram diluídos 18 mL em 2 L de água desionizada. Após agitação contínua desta solução foi efetuada a leitura num espectrofotómetro a 440 nm de absorvância, numa diluição de 1:10 da solução inicial. O ajuste final do valor lido a absorvância 440 nm tem de ser a 0,62 ± 0,10 de absorvância por diluição ou concentração.

O aditivo orgânico é geralmente adicionado ao meio de cultura para fornecer microelementos essenciais para o bom desenvolvimento e crescimento de *Daphnia magna*.

Tabela 8. Composição química do extracto de alga *Ascophyllum nodosum* e as quantidades relativas na forma de pó seco (Fonte: Antunes, 2001).

Composição química	Quantidade utilizada (% e ppm)
Matéria seca	92 - 95%
Matéria orgânica	50 - 55%
Matéria inorgânica	40 - 45%
Nitrogênio	1,40%
Fósforo	0,05%
Potássio	2,50%
Cálcio	1,20%
Magnésio	0,80%
Enxofre	3,70%
Cloro	4,00%
Alumínio	5,0 ppm
Boro	82,0 ppm
Cobalto	1,6 ppm
Cobre	5,0 ppm
Ferro	3000,0 ppm
Iodo	1800,0 ppm
Manganês	12,0 ppm
Níquel	5,0 ppm
Vanádio	0,7 ppm
Zinco	100,0 ppm
Citoquininas e outras hormonas do crescimento	130 - 260 ppm

*Daphnia magna*, em laboratório foi mantida em culturas de grupo com cerca de 20 organismos em frascos com 500 mL de meio ASTM “hard water”. A renovação do meio foi efetuada de dois em dois dias com a transferência dos organismos para um frasco limpo contendo novo meio de cultura mais a microalga *P. subcapitata* com a concentração de  $3,0 \times 10^5$  cels/mL/dia e o aditivo orgânico, conforme volumes já padronizados. A renovação da cultura de *Daphnia magna* foi efetuada com os neonatos nascidos entre a 3ª e 5ª ninhada. Após esta renovação, os organismos foram mantidos de acordo com as condições acima descritas, necessitando de aproximadamente 10 dias se iniciar a reprodução.

## 2.5 Ensaios ecotoxicológicos

A realização dos ensaios ecotoxicológicos efectuou-se de acordo com protocolos padronizados e em condições controladas. Os organismos utilizados eram nascidos com menos de 24 horas e provenientes das ninhadas compreendidas entre a N<sub>3</sub> e N<sub>5</sub> (Barry *et al.*, 2000).

## **2.5.1 Preparação das amostras**

### **2.5.1.1 Amostras de água**

As amostras de água utilizadas para a realização dos ensaios ecotoxicológicos foram filtradas por uma rede de 55  $\mu\text{m}$  de malha (Antunes *et al.*, 2003) de modo a remover as partículas de maiores dimensões em suspensão, possivelmente existentes nas amostras, bem como, qualquer outra impureza.

### **2.5.1.2 Obtenção dos elutriados**

Na avaliação da toxicidade do sedimento foram realizados elutriados a partir dos sedimentos recolhidos nos dois pontos de amostragem. Os elutriados foram preparados e testados durante as 8 semanas seguintes à recolha, de acordo com as normas recomendadas pela USEPA (1998). Para a obtenção dos elutriados foi utilizada a proporção de 1:4 (p/v), de sedimento e ASTM “*hard water*” respetivamente. Este conjunto foi agitado mecanicamente em erlenmeyers durante 12 h a temperatura ambiente; findo este tempo foi deixado a depositar também durante um período de 12 h. Após a sedimentação, o sobrenadante foi cuidadosamente decantado e centrifugado a 19000 RPM durante 10min, para retirar todas as partículas em suspensão. O elutriado foi guardado a 4°C até a sua utilização nos ensaios ecotoxicológicos, nunca excedendo 7 dias após a sua preparação.

Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda e crónica, foi efetuada uma gama de concentrações dos elutriados, através de diluições sucessivas utilizando o meio de cultura ASTM “*hard water*” (ver descrição de ensaios).

## **2.5.2 Ensaio Agudo**

Os ensaios agudos foram realizados às amostras de água e aos elutriados obtidos dos sedimentos, para a avaliação da toxicidade aguda das amostras. Os ensaios efetuaram-se segundo protocolos padronizados (ISO 1996; ASTM 1997; OCDE, 2004) e em condições controladas de temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo ( $16\text{h}^{\text{L}}:8\text{h}^{\text{E}}$ ).

Os ensaios agudos decorreram em tubos de ensaio com 10mL da diluição (efetuada com ASTM “*hard water*”) de água/elutriado correspondente. Em cada diluição foram expostos 20 organismos de *Daphnia magna* divididos em 4 réplicas com 5 organismos cada. Para avaliação da toxicidade aguda foram efetuadas 4 diluições das águas recolhidas (25%, 50%, 75% e 100%) e 6 diluições dos elutriados obtidos (6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100%). O ensaio decorreu ao longo de 48h e findo esse período foram contabilizados o número de organismos mortos ou imobilizados, para

posterior determinação do  $EC_{50}$ , isto é, a concentração/diluição na qual 50% dos organismos foram afectados.

### 2.5.3 Ensaio crónico

Dada a determinação do  $EC_{50}$  para as águas e para os elutriados foram efetuados ensaios crónicos, conforme protocolos padronizados (ASTM 1997; OCDE 1998; ISO 2000). As condições de ensaio foram as mesmas descritas anteriormente para a manutenção de cultura e para ensaios agudos.

O ensaio crónico decorreu ao longo de 21 dias com neonatos nascidos entre a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> ninhadas e com indivíduos com <24h. Para o mesmo, efetuou-se uma gama de diluições das águas amostradas (25%, 50% e 100%) e dos elutriados obtidos (25%, 50% e 75%). Em cada diluição testada foram expostos 10 organismos de *D.magna* individualizados em frascos de 25mL da diluição correspondente. Adicionalmente foi efetuado um controlo nas mesmas condições de ensaio, utilizando-se como meio, o meio de cultura ASTM “hard water” (ASTM, 1980). Dos organismos expostos em cada ensaio, 20 foram medidos inicialmente com o auxílio de lupa binocular. Todos os organismos foram observados diariamente para o registo de mortalidade e do número de ninhadas. Quando estas ocorriam, registava-se o número de neonatos nascidos para posterior descarte dos mesmos. Os organismos foram alimentados diariamente durante a execução dos ensaios com a alga *P. subcapitata* na concentração  $3,0 \times 10^5$  cels/mL/dia e o meio de exposição mais o extracto renovados 3 vezes por semana. No final do período de exposição, 21 dias, todos os indivíduos expostos foram medidos também com o auxílio de lupa binocular.

Com os dados obtidos ao longo dos ensaios crónicos foi possível determinar os seguintes parâmetros: idade à primeira reprodução (dias), número de ninhadas, número total de neonatos, taxa de crescimento somático ( $\text{dia}^{-1}$ ) e a taxa de incremento populacional ( $r \text{ dia}^{-1}$ ). A taxa de crescimento somático foi estimada a partir do tamanho médio inicial dos neonatos e do tamanho final dos organismos expostos, de acordo com a expressão:

$$\text{Taxa de crescimento somático} = \frac{\ln(l_f) - \ln(l_i)}{\Delta t},$$

Onde,  $l_f$  é o tamanho do corpo dos organismos expostos no final do ensaio (em mm),  $l_i$  é o tamanho médio do corpo dos indivíduos no início do ensaio (em mm), medidos numa subamostra de  $n=20$ , de neonatos provenientes da mesma ninhada a qual

foram utilizados os organismos para o ensaio e  $\Delta t$  é o intervalo de tempo da exposição (em dias).

A sobrevivência e a fecundidade foram estimadas através do cálculo da taxa de incremento populacional ( $r$ ), que se calcula através da equação de Euler-Lotka:

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x,$$

Onde,  $r$  aumenta a taxa de incremento populacional ( $\text{dia}^{-1}$ ),  $x$  é a classe de idade em dias ( $0 \dots n$ ),  $l_x$  é a probabilidade de sobrevivência na idade  $x$  e  $m_x$  é a fecundidade na idade  $x$ . Pseudovalores de  $r$  são estimados usando a técnica de “*Jack-knifing*” descrita por Meyer *et al.* (1986).

#### **2.5.4 Microtox®**

O ensaio de Microtox® foi realizado às diferentes amostras recolhidas (água e sedimento), utilizando-se o equipamento Microtox M500 Analyser (Azur Environmental, 1992). O princípio deste ensaio consiste na avaliação da alteração da bioluminescência da bactéria *Aliivibrio fischeri* ao longo de um período de tempo (5, 15 e 30 min). No decorrer deste tempo, as amostras foram incubadas com a bactéria.

#### **2.5.5 Análise estatística**

Os valores de  $EC_{50}$  para os testes de imobilização de *D. magna* e para o ensaio de Microtox®, foram determinados através de uma análise Probit (Finney, 1971). Os parâmetros obtidos no decorrer dos ensaios crónicos foram analisados através de uma análise de variância de uma via (one-way ANOVA). Sempre que se registaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) foi realizado de seguida um teste de Dunnett, de modo à registar as diferenças entre cada diluição da amostra/elutriado e o controlo (Ctl).



## ***Resultados e Discussão***

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Parâmetros físicos e químicos

Na Tabela 9 são apresentados os valores obtidos para os parâmetros medidos *in situ* e no laboratório, referente aos dois locais de estudo – Crestuma-Lever e Marina. Note-se, que os valores de pH registados em ambos os pontos de amostragem aproximam-se do pH neutro. De um modo geral, as águas naturais apresentam pH ligeiramente alcalino em função da presença de compostos carbonatados e bicarbonatos constituintes em alguns tipos de rochas (Wetzel, 1983). Todavia quando da presença de sais e gases dissolvidos resultantes da actividade biológica, o pH sofre alterações para níveis mais alcalinos ou mais ácidos. De acordo com registos históricos das águas da albufeira de Crestuma-Lever, estas apresentam variações de pH bastante próximas dos valores de pH medidos no presente estudo. No entanto, nesta albufeira já se registaram valores de pH mais alcalinos (em junho de 1995, pH = 9,1), em contraste com valores ácidos (em agosto de 2008, pH= 5,68) (informação recolhida no *site* oficial do Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos). Por muito que os organismos aquáticos estejam adaptados a valores de pH entre 6,5 a 8,0, qualquer desvio desta gama pode ocasionar situações de stresse ou mortalidade na fauna e flora aquática (Abreu, 2006).

Os valores de condutividade registados foram muito próximos nos dois locais de amostragem ( $\approx 300 \mu\text{S}/\text{cm}$ , Tabela 9). Segundo Abreu (2006), a condutividade é uma estimativa da concentração iónica total da água, podendo ser utilizada como uma medida alternativa da quantificação de sólidos dissolvidos (minerais, sais, catiões:  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^{++}$ ,  $\text{K}^{++}$  e aniões:  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{=}$ ,  $\text{SO}_4^{=}$ ,  $\text{Cl}^-$ , azoto, ferro e fósforo) (Wetzel, 1983) e como indicador de poluição. De acordo com dados disponibilizados pelo Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (<http://snirh.pt/index.php?idRef=MTM4Ng==&findestacao=crestuma>), a média deste parâmetro em 2011 foi de  $\approx 251 \mu\text{S}/\text{cm}$ , valor na mesma ordem de grandeza do registado no presente estudo.

A temperatura registada nos pontos de amostragem foi elevada, fato que pode ser justificado pela época em que foram efetuadas as amostragens (fim do verão). Lopes (2002), no seu estudo realizado ao longo de um ano na albufeira de Crestuma-Lever obteve variações de temperatura, correspondentes à sazonalidade normal de um ano (mínimo em janeiro de  $9^\circ\text{C}$ ; máxima em setembro de  $26^\circ\text{C}$ ). A temperatura pode influenciar a solubilidade de muitos compostos químicos e, também, os efeitos destes poluentes nos organismos aquáticos. Além disso, este parâmetro tem uma relação

indireta com o teor em oxigénio, uma vez que quanto mais elevada é a temperatura, maior será o consumo metabólico de oxigénio por parte dos organismos (Abreu, 2006).

Tabela 9. Tabela resumo dos parâmetros físicos e químicos medidos *in situ* e em laboratório, nas águas dos dois pontos de amostragem (Crestuma-Lever e Marina).

Parâmetro	Crestuma-Lever	Marina
<b><i>In situ</i></b>		
pH	7,68	7,3
Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	270	300
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	21,7	21,6
Oxigénio Dissolvido ( $\text{mg}/\text{L}$ )	6,72	6,75
(%)	59,0	59,2
Total de sólidos dissolvidos ( $\text{mg}/\text{L}$ )	130	150
Disco de Secchi (m)	2,29	Fundo
<b><i>Em laboratório</i></b>		
Amónia ( $\text{mg}/\text{L NH}_4\text{-N}$ )	$0,047 \pm 0,015$	$0,080 \pm 0,020$
Nitratos ( $\text{mg}/\text{L NO}_3\text{-N}$ )	<ld*	$0,470 \pm 0,060$
Nitritos ( $\text{mg}/\text{L NO}_2\text{-N}$ )	<ld*	<ld*
(Orto)fosfatos ( $\text{mg}/\text{L PO}_4\text{-P}$ )	$0,213 \pm 0,055$	$0,150 \pm 0,070$
Dureza ( $\text{mg}/\text{L CaCO}_3$ )	$158,7 \pm 12,86$	$92,00 \pm 8,000$
Alcalinidade ( $\text{mg}/\text{L HCO}_3$ )	$96,0 \pm 4,36$	$111,7 \pm 2,52$
Turbidez (/mg)	$0,002 \pm 0,000$	$0,048 \pm 0,019$
Carbono orgânico dissolvido (/mg)	$0,048 \pm 0,002$	$0,042 \pm 0,001$
Clorofila <i>a</i> ( $\text{mg}/\text{m}^3$ )	$9,256 \pm 3,083$	$25,632 \pm 1,068$
CBO <sub>5</sub> ( $\text{mg}/\text{L}$ )	$1,527 \pm 0,529$	$2,970 \pm 0,317$

\*ld- limite de detecção.

Note-se que a concentração do oxigénio dissolvido (Tabela 9), registados neste trabalho ( $\approx 6 \text{ mg O}_2/\text{L}$ ) estão em conformidade com os valores limites estabelecidos para as massas de água fortemente modificadas - albufeiras ( $\geq 5 \text{ mg}/\text{L}$ ) previstos pela DQA. Por outro lado, os valores obtidos para o mesmo parâmetro em taxa de saturação apresentaram-se ligeiramente abaixo do limiar estabelecido pela DQA para albufeiras tipo-Norte, para o alcance do Bom Potencial Ecológico = entre 60 e 120%. Bordalo *et al.* (2006) analisaram um conjunto de parâmetros físicos e químicos para as águas da albufeira de Crestuma-Lever em que o valor mais elevado de oxigénio dissolvido (%) registado foi de  $\approx 91,0 \%$ . O oxigénio dissolvido dar-nos-á a informação sobre as reacções bioquímicas e dos processos biológicos que ocorrem normalmente em águas naturais (A.P.H.A, 1989). A presença deste gás na água dá-se por meio da ação do vento, como

produto secundário da fotossíntese ou, ainda, da degradação da matéria orgânica (A.P.H.A, 1989). Assim, um nível satisfatório de oxigénio dissolvido na água ( $\geq 7$  mg/L) é necessário para que muitos organismos possam sobreviver (Wetzel, 1983). Por esta razão, e em alguns casos de contaminação e poluição de recursos hídricos, a ocorrência de elevadas taxas de mortalidade de peixes pode ter origem na diminuição significativa e repentina de oxigénio dissolvido. Esta situação pode ocorrer pela ativação do processo de biodegradação dos poluentes, com o consumo de oxigénio disponível, e nem sempre pela toxicidade destas substâncias propriamente dita (Manahan, 2013).

O conteúdo de sólidos dissolvidos (TSD) registados foi de 130 mg/L para Crestuma e de 150 mg/L para Marina. Dados disponibilizados no *site* do Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos, apresentam uma média de 146,80 mg/L de TSD nas amostragens efetuadas entre 1988 e 2011.

Em Crestuma-Lever a transparência medida através do Disco de Secchi foi de 2,29m e para Marina foi possível observar o fundo ( $\approx 50$  cm). O Disco de Secchi permite-nos avaliar a profundidade alcançada pela penetração da luz. Esta profundidade é importante uma vez que a luz é essencial, tanto para a produção fitoplantónica, para o crescimento e fixação de macrófitas, bem como para a alimentação de peixes, por predação visual. Com a medição da profundidade pode-se obter a medida da transparência da água, a qual pode servir de medida indirecta para a quantificação da turbidez. Assim, a transparência da água é reduzida quando a turbidez é elevada, indicando a presença de material orgânico, compostos inorgânicos (e.g. siltes, areia, argila) entre outros, suspensos na coluna de água (seston). No presente estudo, a turbidez registada na Marina (0,048/mg) foi mais elevada que em Crestuma-Lever (0,002/mg) (Tabela 9). No entanto, a profundidade em Marina normalmente é inferior a 50 cm, podendo ocorrer processos de resuspensão dos sedimentos, afetando, assim, este parâmetro.

A amónia, os nitritos e os nitratos, provenientes principalmente de efluentes urbanos, industriais, lixiviamento de solos e da decomposição da matéria orgânica, são alguns dos diferentes compostos azotados que podem ser encontrados nas águas (Cetesb, 2013; Santos, 2013). Estes elementos constituem um grupo de nutrientes que são utilizados no controlo e monitorização da qualidade da água, funcionando como bons indicadores de poluição dos sistemas aquáticos (Santos, 2013). Os valores de amónia para os locais de estudo foram de  $\approx 0,04$  mg/L e  $\approx 0,08$  mg/L de N-NH<sub>4</sub>, para Crestuma e Marina, respectivamente. Outros autores, em anos anteriores registaram valores próximos para o mesmo ponto de amostragem em Crestuma:  $\approx 0,2$  mg/L N-NH<sub>4</sub> (Bordalo

*et al.* 2006) e 0,2 mg/L N-NH<sub>4</sub> (Cabecinha *et al.* 2009a, 2009b, 2009c). Já o Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos apresenta uma média de 0,13 mg/L de N-NH<sub>4</sub> desde outubro de 1988 até dezembro de 2011. De acordo com Santos (2013) e MIEB (2007/2008) a toxicidade para a fauna piscícola ocorre quando existem valores elevados de amoníaco (NH<sub>3</sub>). Além disso, o MIEB (2007/2008) reporta que para a proteção dos organismos aquáticos o valor aceitável de amoníaco é de 0,05 mg/L, e que a ocorrência de valores na ordem de 0,5 mg/L já é considerado tóxico. Os valores de nitritos registados foram abaixo do limite de deteção do aparelho utilizado, para os dois locais de amostragem (Tabela 9). No entanto, e para este parâmetro, o banco de dados do Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos apresenta picos de nitritos, na albufeira de Crestuma, em janeiro de 1996 (0,3 mg/L N-NO<sub>2</sub>), em julho de 1999 (0,3 mg/L N-NO<sub>2</sub>) e um pico máximo em abril de 2000, tendo-se registado o valor de 0,8 mg/L N-NO<sub>2</sub>. Santos (2013) reporta que as concentrações de nitritos são baixas em ecossistemas dulçaquícolas ou inexistentes. Por outro lado, em lagos eutrofizados observa-se que a concentração deste parâmetro é bastante elevada. Os nitritos são compostos resultantes da oxidação da amónia ou da redução (desnitrificação incompleta) dos nitratos. E, embora os nitritos estimulem o crescimento planctónico, estes compostos são altamente tóxicos para a fauna aquática, nomeadamente para espécies piscícolas. Na presença de oxigénio, os nitritos são convertidos a nitratos ou, quando presentes em ambientes anóxicos, os nitritos são reduzidos a amónia (Santos, 2013). Relativamente à quantificação de nitratos, apenas em Marina se registaram valores para este parâmetro (0,47 mg/L de NO<sub>3</sub>-N). Cabecinha *et al.* (2009a, 2009b, 2009c) apresentaram a média de 5,12 mg/L de NO<sub>3</sub>-N, para Crestuma. Note-se que segundo o Decreto-Lei nº236/98, Anexo VI, o valor máximo admissível de nitratos para a qualidade das águas destinadas para consumo humano é de 50 mg/L de NO<sub>3</sub>. As plantas e as algas necessitam de compostos azotados para seu bom crescimento e desenvolvimento metabólicos, no entanto, a presença excessiva destes compostos na água pode levar a estados de eutrofização, susceptibilizando o ecossistema aquático ao aparecimento de *blooms* algais e de florações de cianobactérias (Santos, 2013). Estas últimas, e de acordo com Vasconcelos (2006), podem produzir dermatoxinas, neurotoxinas e hepatotoxinas, tornando-se um potencial risco para a saúde humana, além de causarem sérios prejuízos para a fauna aquática. Ferreira (1994), Vasconcelos (1993) e Vasconcelos (1999) já registaram o aparecimento de cianobactérias na albufeira de Crestuma-Lever nos anos de 1989 e 1992. De modo a controlar a quantidade de nitratos nos ecossistemas aquáticos foi elaborada uma diretiva específica para este parâmetro - Diretiva Nitratos

(Directiva 91/676/CEE, de 12 de Dezembro) - que exige aos Estados membros a proteção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola, uma medida para a prevenção do enriquecimento por nitratos dos recursos hídricos.

O limiar estabelecido pela DQA, para massas de água fortemente modificadas – albufeiras tipo Norte, para o conteúdo em fósforo total é de  $\leq 0,05$  mg P/L. O fósforo pode aparecer em três diferentes formas na água, fosfatos orgânicos, ortofosfatos e os polifosfatos. Os dois primeiros são as formas mais importantes deste nutriente para o controlo da qualidade da água (Cetesb, 2013). Wetzel (1983) refere que os nutrientes como fósforo e azoto após serem assimilados pelo zooplâncton são excretados sob a forma de iões fosfato e amónia, dos quais parte permanece nas partículas fecais, depositando-se nos sedimentos e o restante é novamente assimilado pelo fitoplâncton. Além disso, o fósforo, na forma de fosfato (composto inorgânico solúvel), além de ser um nutriente essencial para o desenvolvimento e desempenho metabólico dos organismos é, juntamente com os compostos azotados (e.g. nitratos) um dos nutrientes responsáveis pelo processo de eutrofização em lagos e albufeiras (Cetesb, 2013; Santos, 2013). O estado de eutrofização é tipicamente relacionado com a concentração de fósforo total, a concentração de clorofila *a* e a transparência da água (Ainsworth, 2000; Pereira e Rodrigues, 2005; Santos, 2013). Os valores para o ião fosfato, determinados no presente estudo, apresentaram-se acima do limite estipulado pela DQA ( $\leq 0,05$  mg P/L), 0,213 mg/L  $\text{PO}_4\text{-P}$  para Crestuma e 0,150 mg/L  $\text{PO}_4\text{-P}$  para Marina. A recolha das amostras ocorreu após um período em que se registaram algumas chuvas podendo atribuir-se os valores obtidos para fosfatos à possível escorrência de solos fertilizados para o interior da albufeira, ou ainda possivelmente pela libertação de fósforo a partir dos sedimentos de fundo. No estudo de Lopes (2002), foram registados elevados valores de fósforo no centro da albufeira (de 0,3 mg P/L).

Os valores para a dureza da água observados foram mais elevados para as águas de Crestuma-Lever ( $\approx 158,7$  mg/L) (Tabela 9), reflectindo um alto teor em material mineral que, segundo o INAG (2009), é característico em albufeiras de curso principal, as quais apresentam uma maior carga de nutrientes, alcalinidade, dureza, condutividade. Cabecinha *et al.* (2009a), no seu estudo entre 1996 e 2004, registaram para o mesmo local de Crestuma-Lever valores semelhantes de dureza (104 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ ).

O carbono orgânico dissolvido (COD) expressa a quantidade de moléculas orgânicas presentes nos ecossistemas aquáticos de origens e composição diversas. A principal fonte de COD nas águas superficiais ocorre pelo lixiviamento de solos e pela decomposição da matéria orgânica (Sucker e Krause, 2010). Lopes (2002) reporta que a

presença deste elemento nas albufeiras resulta essencialmente da actividade fotossintética. Häder *et al.* (1998) destacam que o COD é o produto da degradação dos organismos de vida aquática e de grande importância para a reciclagem do carbono nos ecossistemas aquáticos. O COD além de reduzir a intensidade da radiação solar na coluna de água, tem forte afinidade com nutrientes inorgânicos e metais (Williamson *et al.*, 1999). Na Tabela 9 é possível observar os valores de COD registados nos locais de estudo (Crestuma:  $\approx 0,048$  mg/L e Marina:  $\approx 0,042$  mg/L).

A produtividade fitoplanctónica foi registada no presente estudo através da quantificação da clorofila *a* (Tabela 9). Marina, apresentou um valor mais elevado de concentração em Clorofila *a* ( $\approx 25$  mg/m<sup>3</sup>) do que Crestuma-Lever ( $\approx 9$  mg/m<sup>3</sup>). Ainda para a albufeira de Crestuma-Lever, outros estudos registaram valores de clorofila *a* maiores do que os registados neste estudo; Lopes (2002), no seu estudo, registou picos de Clorofila *a* (13 mg/m<sup>3</sup>) nos meses de novembro de 2000 e julho de 2001. Fidalgo (1990) registou, em 1989, durante o mês de julho 40 mg/m<sup>3</sup>. De acordo com a DQA, para a avaliação do Potencial Ecológico de albufeiras o elemento de qualidade biológica recomendado é o fitoplâncton. Para tal devem ser analisadas as componentes da sua composição, abundância e biomassa, e para a biomassa devem ser quantificados a concentração de clorofila *a*, o biovolume total, biovolume de cianobactérias (%) e índice de algas - IGA. No presente estudo, apenas o indicador Clorofila *a* foi utilizado para fins de avaliação do Potencial Ecológico da albufeira Crestuma-Lever e da massa de água à qual se estende a Marina. Assim, e de acordo com INAG (2009), para o elemento Clorofila *a* foi calculado o Rácio de Qualidade Ecológica (RQE) através da seguinte equação:

$$RQE = (1/\text{valor obtido})/(1/\text{valor referência})$$

Em estudos de monitorização e avaliação da qualidade da água, é utilizada a combinação dos RQEs dos diferentes indicadores mencionados. No entanto, e de modo a que estes valores sejam comparáveis, para albufeiras do tipo Norte, é necessário normalizar os valores de RQE obtidos para uma escala semelhante. Assim, e para o parâmetro da clorofila *a* procedemos desta forma de acordo com as seguintes equações:

Tabela 10. Normalização dos RQEs (Fonte: *adaptado de* INAG, 2009).

ONDE RQE > 0,21	ONDE RQE < 0,21
Crestuma-Lever	Marina
RQE normalizado = $(0,5063 * 0,2160) + 0,4937$	RQE normalizado = $0,0390 * 0,078$

A Tabela 11 apresenta um resumo de todos os cálculos relativamente aos RQEs e classifica, com base no que é determinado pelo INAG (2009) e em conformidade com o mesmo, o Potencial Ecológico para o fitoplâncton da massa de água de Crestuma-Lever e Marina. De acordo o INAG (2009) o valor 0,6 de RQE normalizado é o nível que diferencia a classificação em Superior ou Bom para Razoável, Medíocre ou Mau. No entanto, e para uma classificação mais correta, os restantes elementos fitoplanctónicos deveriam entrar no cálculo através do somatório das médias aritméticas de cada um deles (clorofila *a* com o biovolume total, % biovolume de cianobactérias com IGA, e depois entre estes).

Tabela 11. Tabela resumo dos cálculos do RQE e classificação do Potencial Ecológico para o fitoplâncton para os dois locais de amostragem.

	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g/L}$ ou $\text{mg/m}^3$ )	RQE	RQE Normalizado	Classificação
<b>CRESTUMA-LEVER</b>	9,256	0,2160	<b>0,603</b>	Superior ou Bom
<b>MARINA</b>	25,632	0,0780	<b>0,223</b>	Razoável/Medíocre/Mau

Os valores de CBO<sub>5</sub> registados foram mais elevados para Marina do que para Crestuma-Lever (Tabela 9). Segundo Calisto e Trancoso (2005) CBO<sub>5</sub> é um parâmetro ambiental que consiste em quantificar o oxigénio consumido pelos microrganismos aeróbios para a degradação da matéria orgânica presente na amostra (Santos, 2013), após 5 dias de incubação, a 20°C no escuro. De acordo com esta quantificação, é possível obter-se uma estimativa do nível de poluição orgânica existente num determinado ecossistema aquático dulçaquícola. Bordalo *et al.* (2006) registaram para este parâmetro um valor médio de 1,30 mg/L em Crestuma-Lever, durante um período de amostragem que ocorreu entre 1992 e 2001. Os dados disponibilizados pelo Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos, para um período de amostragem, permitem mencionar que a média de CBO<sub>5</sub> em Crestuma-Lever de outubro de 1988 a dezembro de 2011 é de 1,5 mg/L, valor idêntico ao registado no presente estudo para o local de Crestuma-Lever ( $\approx 1,5\text{mg/L}$ ). No entanto, esta estabilidade é facilmente quebrada, tal como descrito por Cabecinha *et al.* (2009a), através de descargas de



efluentes industriais, do desenvolvimento urbano e agricultura intensiva que afectam a qualidade da água das albufeiras construídas ao longo do rio Douro.

Assim e à luz dos resultados obtidos pode-se concluir, de acordo com os parâmetros físicos e químicos avaliados, que para o ponto Marina, devido às suas características de águas paradas e de pouca profundidade favoreçam a maior concentração de matéria orgânica e uma maior produtividade primária, implicando em valores mais elevados para o CBO<sub>5</sub> e para o conteúdo em clorofila *a*, respectivamente. Por essa razão, de referir que nos ciclos do oxigénio, azoto e carbono a presença das bactérias é fundamental para a produção e decomposição da matéria orgânica, de modo a contribuir essencialmente nos processos de autorregulação e autodepuração de ecossistemas aquáticos contaminados (Abreu, 2006). Mais, devido às dragagens que frequentemente ocorrem no leito principal do rio Douro (Azevedo *et al.*, 2005), justificam-se os valores mais elevados para nutrientes como o teor em fosfatos, em Crestuma-Lever, possivelmente resultantes da ressuspensão dos sedimentos. Todavia, o valor para fosfatos parece não comprometer a qualidade da massa de água em questão. Em suma, e de acordo com os parâmetros físicos e químicos analisados, propostos na DQA, as águas nos dois locais de estudo não parecem apresentar valores críticos para serem classificadas como massas de água com o Potencial Ecológico Bom para Crestuma-Lever e Razoável para Marina. Tais classificações são corroboradas pelos dados obtidos através do elemento biológico analisado clorofila *a* (ver Tabela 11).

### 3.2 Ensaio ecotoxicológicos

Relativamente aos ensaios agudos efetuados não se registou toxicidade para os diferentes níveis tróficos avaliados. *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri* não foram significativamente afetados após exposição aguda quer às águas naturais de Crestuma-Lever e Marina, quer para os elutriados preparados a partir dos sedimentos, provenientes de cada ponto de amostragem. Para *D. magna*, e apenas para os organismos expostos a 100% do elutriado da Marina, se observou alguma imobilidade/mortalidade, no entanto, não foi possível a determinação de um EC<sub>50</sub>. Por este motivo e de modo a evitar elevadas taxas de mortalidade nos ensaios crónicos, para os sedimentos provenientes dos dois locais de estudo optou-se por utilizar 75% da diluição de elutriado como o tratamento mais elevado para os ensaios crónicos.

Os parâmetros medidos nos ensaios crónicos com *D. magna*, quando exposta às águas naturais e elutriados, apresentam-se na Figura 8 e Tabela 12. De um modo geral

não se registaram efeitos deletérios, sendo observado, por vezes, aparentes fenómenos estimulatórios.

Relativamente à idade da 1ª reprodução, esta foi significativamente antecipada apenas para os organismos expostos ao elutriado dos sedimentos da Marina na diluição mais pequena (25%) (Figura 8 e Tabela 12). Esta antecipação poderia estar associada à ocorrência de fenómeno estimulatório hormético, no entanto, a idade à 1ª reprodução de *D. magna* em condições normais ocorre entre o 8º e 10º dia após o nascimento (Jonczyk & Gilron, 2005).

O fenómeno hormesis, que se caracteriza pela capacidade de estimulação nos parâmetros da história de vida (e.g. da reprodução, do crescimento, incremento populacional) a baixas concentrações seguido de forte inibição a elevadas concentrações, foi já observado em diversos estudos (Antunes *et al.*, 2007a; Antunes *et al.* 2007b; Calabrese *et al.*, 2013). Este efeito estimulatório é justificado por vários autores, nomeadamente em *D. magna* e *D. longispina*, quando estes organismos são expostos a efluentes e elutriados. A existência de bactérias e outros constituintes do necton poderão servir como uma fonte adicional de alimento, promovendo este fenómeno (Sibley *et al.*, 1997; Chapman, 2000; Podemski e Culp, 2001; Antunes *et al.*, 2007a; Antunes *et al.*, 2007b). Por outro lado, existem estudos em que se observou o efeito contrário: Martinez-Madrid *et al.* (1999), observaram um atraso na idade à 1ª reprodução para *D. magna*, quando exposta a elutriados preparados a partir de sedimentos de fundo do rio Nervion (históricamente contaminados); Pereira *et al.* (2009), registaram também um atraso significativo de *D. magna* na idade à 1ª reprodução quando exposta a um efluente do tratamento do branqueamento da pasta de papel.

Em relação ao número total de neonatos, na universalidade das amostras não se registaram diferenças significativas em relação ao controlo, com exceção para a diluição mais pequena do elutriado de Crestuma (Figura 8 e Tabela 12). Este padrão foi também observado por Martinez-Madrid *et al.* (1999) que registaram aumento no número total de neonatos e na biomassa final de *D. magna* quando exposta a baixas concentrações de elutriado preparado a partir do sedimento de fundo de um rio. Antunes *et al.* (2007b) também registaram aumento no número de neonatos para *D. magna* e *D. longispina* quando expostas a elutriados preparados a partir de sedimentos de lagoas de sedimentação de uma mina de urânio. Um padrão contrário é registado para a água da Marina, onde se observa uma aparente diminuição do número de neonatos ao longo das diluições, no entanto, sem registo de diferenças significativas. Alguns indivíduos expostos à água proveniente da Marina deram origem a ovos inviáveis. Estes não foram

quantificados e analisados estatisticamente, no entanto, a sua ocorrência poderá indicar uma situação de stress sobre os organismos. Uma possível explicação prende-se com o fato de as embarcações geralmente utilizarem tintas que contêm compostos orgânicos com propriedades anti-incrustantes. Alguns destes compostos orgânicos podem apresentar toxicidade para organismos aquáticos. O tributilestanho (TBT), proibido em 2008 pela Organização Marítima Internacional, ficou bastante conhecido devido à elevada toxicidade que apresenta para os organismos aquáticos. Dentre os efeitos reportados pela exposição a este composto estão: a diminuição de jovens recém-fixados nas embarcações, anomalias de desenvolvimento nas larvas, *balling*, e a ocorrência de impossexo observado em moluscos (Castro *et al.*, 2011). Atualmente, outros biocidas frequentemente utilizados com o mesmo fim do TBT têm vindo a ser analisados para a verificação do potencial deletério que podem causar as espécies aquáticas. No entanto, note-se que no presente estudo não foi quantificada nenhuma substância prioritária/polvente específico, sendo, portanto, apenas uma hipótese levantada/apresentada, uma vez que estudos anteriores já quantificaram valores de contaminantes (Trancoso *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2009).

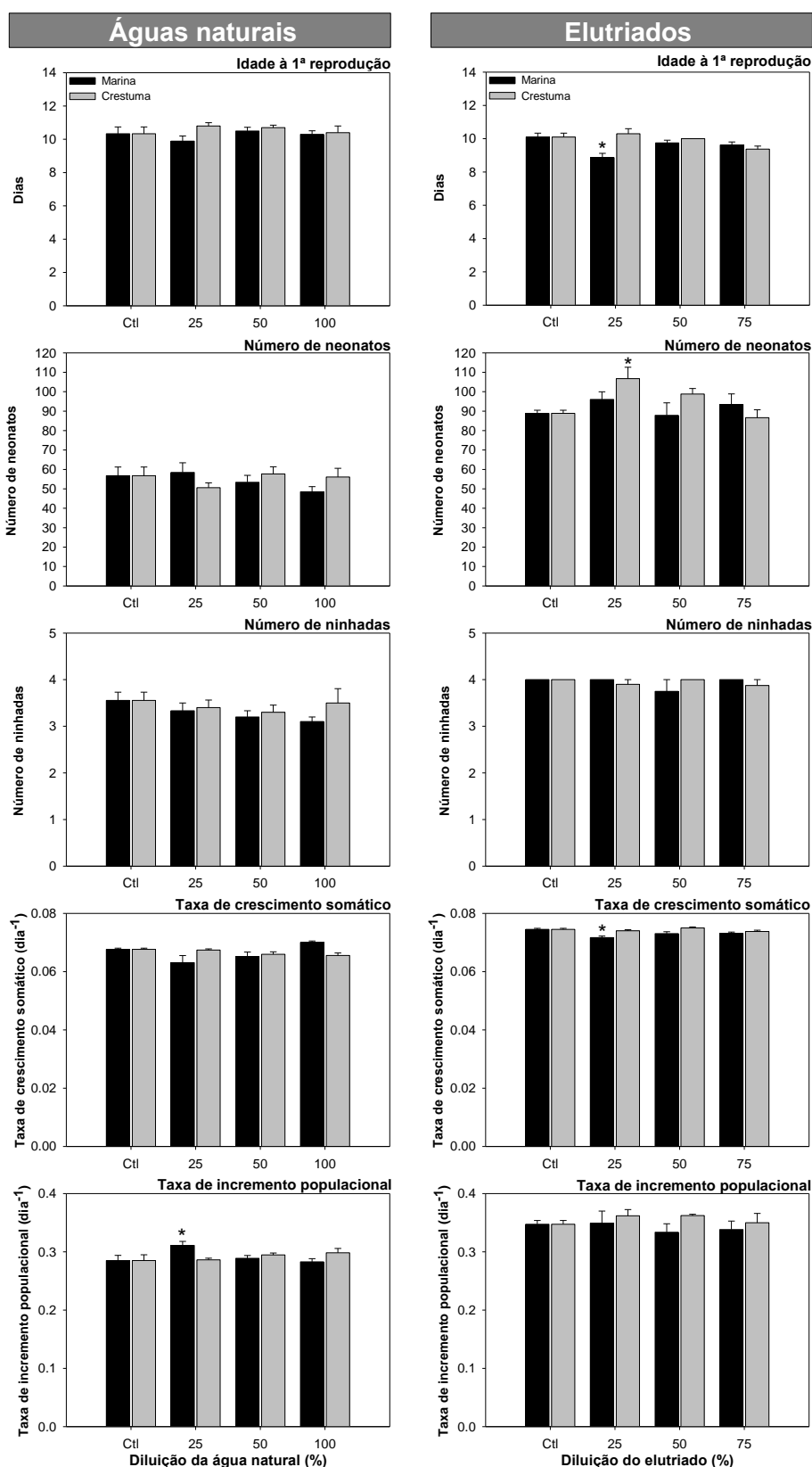
Relativamente à taxa de crescimento somático, também não se registaram diferenças significativas nas diferentes diluições para as águas naturais. No entanto, para o elutriado da Marina na diluição mais baixa (25%) registou-se um decréscimo significativo deste parâmetro (Figura 8 e Tabela 12). Efeito contrário a este foi reportado no estudo conduzido por Antunes *et al.* (2007b), o qual apresentou um aparente fenómeno estimulatório na taxa de crescimento somático para *D. magna* e *D. longispina*, expostas as concentrações acima dos 12,5% de elutriados.

A taxa de incremento populacional ( $r$ ) é o parâmetro integrador da história de vida de *D. magna*, uma vez que leva em consideração a informação relativa dos parâmetros avaliados e a influência que cada indivíduo tem na população. Stark *et al.*, (1997) e Jager *et al.* (2006) reportam que o sucesso da reprodução, em particular a taxa de incremento populacional ( $r$ ) tem sido recomendada em laboratórios com análises ecotoxicológicas porque combina efeitos letais e subletais em um único e significativo parâmetro. De um modo geral, o padrão de respostas obtido para a taxa de incremento populacional, não foi significativamente afetado quer para as águas naturais quer para os elutriados. A única exceção a esta situação foi observada para a água natural da Marina na diluição de 25%, registando-se um incremento significativo deste parâmetro. Contrariamente ao observado neste estudo, Antunes *et al.* (2007a) registou efeitos negativos para a taxa de incremento populacional em *D. magna* quando exposta a um efluente de mina de urânio. Os

principais parâmetros da história de vida de *Daphnia* (crescimento e sobrevivência) são dependentes da entrada de energia na forma de alimentação (Villarroel *et al.*, 2003). As alterações no comportamento alimentar - geralmente induzidas por contaminantes - podem ter consequências significativas, nomeadamente em alterações na taxa de incremento populacional (Taylor *et al.*, 1998). Além disto, Fenchel (1974) reporta que num ambiente constante, sem perturbações, as populações tendem a crescer, apresentando um aumento da taxa de incremento populacional ( $r$ ).

Vários autores referem que os ensaios ecotoxicológicos são complexos uma vez que em determinados contextos poderão não ser totalmente realistas, por se efetuarem em condições laboratoriais controladas, diferentemente do que acontece nos ecossistemas naturais (Chapman, 2000; Antunes *et al.*, 2003; 2007a). Por outro lado, as respostas podem diferenciar-se de acordo com as diferentes espécies escolhidas para execução dos testes (padrão ou autóctones), uma vez que a sensibilidade de espécies é diferente. Assim, e uma vez que *D. magna* é uma espécie padrão, a adopção da espécie *D. longispina* como complemento nos ensaios ecotoxicológicos deste estudo poderia-nos fornecer uma avaliação da qualidade da água da albufeira de Crestuma-Lever mais realista, visto que esta última espécie é autóctone em águas portuguesas (Antunes *et al.*, 2007a). Outro exemplo de variações nas respostas observadas para diferentes espécies de cladóceros foi reportado por Vasconcelos (1999), que verificou que *Ceriodaphnia pulchella* apresentou menor sensibilidade quando exposta a estirpes tóxicas e não tóxicas de *Microcystis aeruginosa* enquanto *Daphnia longispina* foi afectada mais significativamente. Mais ainda, espécies mais pequenas de cladóceros parecem ser menos afectadas aquando da ocorrência de *blooms* de cianobactérias (Vasconcelos, 1999). Por outro lado, Koivisto *et al.* (1992) reportam que o tamanho de *Daphnia magna* pode aumentar a sua tolerância a compostos tóxicos em comparação com cladóceros mais pequenos e mesmo com outras espécies zooplantónicas.

A similaridade dos resultados nos tratamentos testados é evidente, não se observando efeitos negativos a nível reprodutivo e populacional em *Daphnia magna*.



**Figura 8.** Resultados obtidos para os parâmetros referentes ao crescimento e reprodução de *D. magna*, nos ensaios crónicos, após exposição às águas naturais e aos elutriados - preparados a partir dos sedimentos recolhidos nos dois pontos de amostragem: Crestuma-Lever e Marina. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão das 10 réplicas utilizadas para cada diluição. \*Representa as diferenças estatísticas registadas entre o Ctl e as respectivas diluições testadas para cada local.

Uso de ferramentas ecotoxicológicas na avaliação da qualidade da água: um caso de estudo na albufeira de Crestuma-Lever (Norte de Portugal)

Tabela 12. Tabela resumo da análise de variâncias de uma via aplicada aos parâmetros quantificados nos ensaios crónicos com *D. magna* exposta às águas naturais e aos elutriados (g.l. - graus de liberdade; QM – quadrados médio; *F* - *F* estatístico (QMfactor/QMresidual), *P*- probabilidade). Os valores a negrito evidenciam os parâmetros para os quais se registam diferenças significativas.

	Parâmetro	g.l.	QM	<i>F</i>	<i>P</i>
<b>Águas naturais</b>					
<b>C</b>	Idade à 1ª reprodução	3, 35	0,497	0,541	0,657
	Número de neonatos	3, 35	5,24E <sup>-3</sup>	0,667	<b>0,578</b>
	Número de ninhadas	3, 35	0,123	0,282	0,838
	Taxa de crescimento somático	3, 34	1,04E <sup>-5</sup>	2,542	0,073
	Taxa de incremento populacional	3, 36	4,12E <sup>-4</sup>	1,079	0,370
<b>M</b>	Idade à 1ª reprodução	3, 33	0,644	0,777	0,515
	Número de neonatos	3, 33	8,70E <sup>-3</sup>	1,050	0,384
	Número de ninhadas	3, 33	0,266	1,349	0,275
	Taxa de crescimento somático	3, 33	8,63E <sup>-5</sup>	4,237	<b>0,012</b>
	Taxa de incremento populacional	3, 36	1,69E <sup>-3</sup>	3,831	<b>0,018</b>
<b>Elutriados</b>					
<b>C</b>	Idade à 1ª reprodução	3, 34	1,366	3,123	<b>0,039</b>
	Número de neonatos	3, 34	0,015	5,814	<b>0,003</b>
	Número de ninhadas	3, 34	0,039	0,765	0,522
	Taxa de crescimento somático	3, 34	2,73E <sup>-6</sup>	2,217	0,104
	Taxa de incremento populacional	3, 36	6,10E <sup>-4</sup>	0,587	0,628
<b>M</b>	Idade à 1ª reprodução	3, 29	2,168	5,648	<b>0,004</b>
	Número de neonatos	3, 28	0,0014	0,426	0,736
	Número de ninhadas	3, 28	0,000	1,000	1,000
	Taxa de crescimento somático	3, 24	9,49E <sup>-6</sup>	5,436	<b>0,005</b>
	Taxa de incremento populacional	3, 36	5,45E <sup>-4</sup>	0,244	0,865

## ***Considerações Finais***

## 4 Considerações Finais

A elaboração da Lei nº58/2005, Lei da Água, como instrumento indicativo e regulamentador legislativo em Portugal, foi um contributo essencial no que compete a gestão dos recursos hídricos, tendo em vista seu carácter inovador, a sua abrangência e transversalidade. Brils (2008) reporta que a DQA fornece uma aproximação nova, global e integrada à proteção, melhoramento e uso sustentável da água, bem como, uma abordagem combinada para os limites de emissão e para os padrões de qualidade. Ferreira *et al.* (2009), por sua vez, mencionam que a DQA *propõe uma tipologia de base abiótica* apoiada em variáveis físico-químicas e hidromorfológicas. Desta maneira, diferentes condições abióticas irão constituir diferentes comunidades biológicas, podendo estas serem observadas na sua composição, estrutura ou organização ecológica.

A avaliação de elementos da qualidade biológica, como o fitoplâncton, desempenha um papel relevante como indicador ecológico, pelo que representam a base da teia alimentar e respondem rapidamente aos stresses e perturbações provenientes das actividades humanas (Cabecinha *et al.*, 2009a). Além disso, factores abióticos variam no tempo e espaço e dada a complexidade destas variações, o acompanhamento e o armazenamento de informações resultantes da avaliação dos elementos hidromorfológicos e elementos de qualidade (biológicos, físicos e químicos) é de extrema importância para o aperfeiçoamento do conhecimento científico e prático relativamente aos diferentes tipos de ecossistemas aquáticos. De referir também que a solução para os problemas ambientais não se baseia unicamente na adoção de ferramentas chave como a quantificação de substâncias e o uso bioindicadores ambientais. Deve-se também considerar os princípios apresentados pela Directiva Quadro da Água, como a proteção e a prevenção. Deste modo possivelmente reduzir-se-ão as pressões exercidas sobre os ecossistemas aquáticos ou a interferência será em menor magnitude sobre a capacidade de autodepuração dos sistemas naturais sujeitos às perturbações.

No entanto, são já reconhecidas algumas lacunas dentro da abordagem de avaliação proposta pela DQA relativamente a:

1. Ao controlo da qualidade dos sedimentos (fundamentalmente importantes para a determinação da qualidade de massas de água);
2. À inexistência de valores limites, i.e., de fronteira para alguns parâmetros de monitorização físico-químicos e dos elementos da qualidade biológica para as massas de água fortemente modificadas - albufeiras;

Levando em consideração estas questões, alguns autores têm vindo a trabalhar no sentido de propor novos modelos ou complementares para utilização numa avaliação



ecológica mais realista e exequível. Neste contexto, é importante realçar que ultimamente muitos têm sido os incentivos para a criação de métodos e/ou ferramentas de prevenção, controlo, identificação, monitorização de fontes poluidoras e do estado da qualidade dos ecossistemas.

No presente estudo, foi efetuada a avaliação da qualidade da água de dois pontos na albufeira de Crestuma-Lever através de duas abordagens: a perspectiva da DQA (apoiada em alguns parâmetros físicos e químicos e no elemento biológico fitoplanctónico - clorofila *a*) e a de ensaios ecotoxicológicos. De salientar que neste estudo não foi quantificada a concentração de nenhuma substância prioritária (metais, pesticidas, ou qualquer outro contaminante) proposta pela DQA. No entanto, recorremos sempre que necessário a dados disponíveis na literatura, apresentados e discutidos por outros autores, salvaguardando sempre que existe uma grande variabilidade destes dados e que a quantificação destes contaminantes apenas reflectem o estado do sistema nessa altura, de forma pontual.

Em suma e de acordo com os dados obtidos nos parâmetros de avaliação segundo a DQA, no presente caso de estudo, a água da albufeira de Crestuma-Lever, em dois pontos distintos, não apresentou valores preocupantes (parâmetros físicos e químicos e quantificação da clorofila *a*). Relativamente à abordagem da avaliação das águas naturais e elutriados através da realização de ensaios ecotoxicológicos, não se registou toxicidade aguda nem crónica. Esta avaliação corroborou os dados obtidos pelos parâmetros físicos e químicos concluindo que a água de Crestuma-Lever apresentou uma qualidade boa e a Marina apresentou uma qualidade razoável, para o período de amostragem do estudo.

Na perspectiva de trabalho futuro e tendo como base os resultados aqui obtidos sugere-se um acompanhamento mensal dos parâmetros físicos e químicos. Sempre que estes apresentarem valores anormais, dever-se-á recorrer a ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ecológica das massas de água. Paralelamente, a quantificação das substâncias prioritárias determinadas em legislação específica e a adopção da espécie *D. longispina* (que apresenta maior relevância ecológica para Portugal) para processos de monitorização parece serem parâmetros fundamentais, dando informação também sobre o funcionamento do ecossistema.

## ***Referências Bibliográficas***

## 5 Referências Bibliográficas

- Abreu, M.I.S.R., 2006. Caudais ecológicos em Portugal: situação atual e perspectivas futuras. Tese de Mestrado em Ecologia Ambiente e Território. Faculdade de Ciências. Universidade do Porto.
- Adelman, I.R., Kusilek, L.I., Koehle, J., Hess, J., 2009. Acute and Chronic Toxicity of Ammonia, Nitrite and Nitrate to the Endangered Topeka Shiner (*Notropis topeka*) and Fathead Minnows (*Pimephales Pormelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **28(10)**: 2216-2223.
- Ainsworth, R.G., 2000. Eutrophication of freshwaters. Review of Current Knowledge. Foundation for Water Research, Marlow, Buckinghamshire, 19pp.
- Antunes, S.C., 2001. Variabilidade clonal de respostas crónicas de *Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares. Dissertação apresentada para a obtenção de grau de mestre em Ciências das Zonas Costeiras. Departamento de Biologia. Univesidade de Aveiro. Portugal.
- Antunes, S.C., Abrantes, N., Gonçalves, F., 2003. Seasonal variation of the abiotic parameters and the cladoceran assemblage of Lake Vela: comparison with previous studies. *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology* **39**: 255-264.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Gonçalves, F., 2004. Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. *Environmental Pollution* **127 (3)**: 367-375. Elsevier.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007a. Acute and Chronic Toxicity of Effluent Water from an Abandoned Uranium Mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**: 207-2013.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007b. Evaluation of the Potential Toxicity (acute and chronic) of Sediments from Abandoned Uranium Mine Pounds. *Journal of Soils Sediments* **7(6)**: 638-376.
- APA, 2012. Agência Portuguesa do Ambiente. Administração da Região Norte. Plano de Gestão da Bacia Hidrográfica do Douro. RH3. Relatório de Base. Parte 2 Caracterização e Diagnóstico da Região Hidrográfica. Comissão Europeia.
- A.P.H.A., 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater – 17th Edition. American Public Health Association, Washington, DC, USA.

- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater – 18th Edition. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- ASTM, 1980. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E 729-80. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- ASTM, 1997. Standard guide for *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests, Report E1193-97. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- Azevedo, B., Duarte, P., Bordalo, A.A., 2005. Análise e Verificação de um Modelo Ecológico para a Albufeira de Crestuma-Lever. *Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia* **2**: 8-25.
- Azur Environmental, 1992. Microtox® Manual (data capture and reporting program). In: *A Toxicity Testing Handbook*, **Vol. 2**: Detailed protocols and **Vol. 3**: Condensed protocols. Carlsbad, CA.
- Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M.C., Calow, P., 1989. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity test: problems and prospects. In: *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*. Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen, F., editors. Denmark: Lyngby, p.144-148.
- Ball, P., 1999. H2O: A Biography of Water. Weidenfeld & Nicolson. England. United Kingdom.
- Barry, M.J., Meehan, B.J., 2000. The acute and chronic toxicity of lanthanum to *Daphnia carinata*. *Chemosphere* **41**: 1669-1674.
- Beyene, A., Addis, T., Kifle, D., Legesse, W., Kloss, H., Triest, L., 2009. Comparative study of diatoms and macroinvertebrates as indicators of severe water pollution: case study of Kebena and Akaki rivers in Addis Ababa, Ethiopia. *Ecological Indicators* **9**: 381-392. Elsevier.
- Blaise, C., 1991. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects. *Environmental Toxicology* **6(2)**: 145-155.
- Bordalo, A.A., Teixeira, R., Wiebe, W.J., 2006. A Water Quality Index Applied to an International Shared River Basin: The Case of the Douro River. *Environmental Management* **38**: 910-920. Springer.

- Bridges, T.S., Wright, R.B., Gray, B.R., Gibson, A.B., Dillon, T.M., 1996. Chronic toxicity of Great Lakes sediments to *Daphnia magna*: elutriate effects on survival, reproduction and population growth. *Ecotoxicology* **5**: 83-102.
- Brils, J., 2008. Sediment monitoring and the European Water Framework Directive. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* **44(3)**: 218 – 223.
- Cabecinha, E., Cortes, R., Pardal, M.A., Cabral, J.A., 2009a. A Stochastic Dynamic Methodology (StDM) for reservoirs water quality management: validation of a multi-scale approach in a south European basin (Douro, Portugal). *Ecological Indicators* **9**:329-345.
- Cabecinha, E., Cortes, R., Cabral, J.A., Ferreira, T., Lourenço, M., Pardal, M.A., 2009b. Multi-scale approach using phytoplankton a a first step towards the definition of the ecological status of reservoirs. *Ecological Indicators* **9**:240-255.
- Cabecinha, E., Lourenço, M., Moura, J.P., Pardal, M.A., Cabral, J.A., 2009c. A multi-scale approach to modelling spatial and dynamic ecological patterns for reservoir's water quality management. *Ecological Modelling* **220**: 2559-2569.
- Cairns, J.jr., 1992. The threshold problema in ecotoxicology. *Ecotoxicology* **1**:3-16. Chapman & Hall.
- Calabrese, E.J, Iavicoli, I., Calabrese, V., 2013. Hormesis: Its impact on medicine and health? *Human and Experimental Toxicology* **32(2)**: 120-152.
- Calisto, S. e Trancoso M.A., 2005. Protocolo A Carência Bioquímica de Oxigénio em Águas Residuais pelo Método Manométrico: Estimativa de Incerteza da Medição. Laboratório de Análises Ambientais e de Ocntrolo da Qualidade – INETI. Lisboa. Portugal. 1ª Conferência Nacional – medir mais e melhor. Caparacica.
- Cameron, J. e Abouchar, J., 1991. The Precautionary Principle: A Fundamental Principle of Law and Policy for the Protection of the Global Environment. *Environmental Health and Protection Commons* **14(1)**:1-27. B.C. Int'l & Comp. L.
- Carpenter, S.R., Stanley, E.H, Vander Zanden, M.J., 2011. State of the World's Freshwater Ecosystems: Physical, chemical and biological changes. *Annual Review of Environment and Resources* **36**:75-99.
- Casado, A.M.A, 2008. Sistemas de indicadores para a caracterização da qualidade de águas superficiais: um caso de estudo. Tese de Mestrado em Engenharia Municipal. Escola de Engenharia. Universidade do Minho, Portugal.

- Castillo, G.C., Vila, I.C, Neild, E., 2000. Ecotoxicity Assessment of Metals and Wastewater using Multitrophic Assays. *Environmental Toxicology* **15**: 370-375.
- Castro, I.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de Terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova* **34 (6)**: 1021-1031.
- Chapman, P.M., 2000. Whole Effluent toxicity testing – usefulness, level of protection and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19(1)**: 3-13.
- Chen, F., 2012. The Chronic Aquatic Toxicity of a Microbicide Dibromonitrilopropionamide. *Toxicology and Industrial Health* **28(2)**: 181-185.
- Decreto-Lei nº236/1998, de 1º de Agosto. *Diário da República nº 176/98 – I Série-A - Anexo VI*. Ministério do Ambiente.
- Decreto-Lei nº77/2006, de 30 de Março. *Diário da República nº 64/06– I Série-A*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- Decreto-Lei nº 344/2007, de 15 de Outubro. *Diário da República nº 1998/07 – I Série*. Ministério das Obras Públicas, Transportes e Comunicações. Lisboa.
- Decreto-Lei nº 97/2008, de 11 de Junho. *Diário da República. Iª -Série – Nº111*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e Desenvolvimento Regional.
- Decisão da Comissão nº 915/2008/CE de 30 de Outubro. *Jornal Oficial da União Europeia nº L 332/20*. [Notificada com o número C (2008)6016]. Texto relevante para efeitos do EEE (2008/915/CE).
- Directiva 91/676/CEE, de 12 de Dezembro. Protecção das Águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola. Comissão Europeia. Direcção Geral do Ambiente.
- Directiva 2000/60/CE de 23 de Outubro. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias. L 327/1*.
- Directiva 2008/105/CE, de 16 de Dezembro. Normas de Qualidade Ambiental no domínio da política da água. *Jornal Oficial da União Europeia L 348/84*.
- EEA, 1999. European Environment Agency, 1999. Environmental indicators: Typology and overview. Technical Report nº25.
- Fenchel, T., 1974. Intrinsic Rate of Natural Increase: The relationship with body size. *Oecologia (Berl)* **14**: 317-326. Springer.

- Ferreira, F.M.B., 1994. Caracterização bioquímica de cianotoxinas produzidas por duas espécies de cianobactérias provenientes da albufeira de Crestuma-Lever, rio Douro. Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências para obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada. Universidade do Porto.
- Ferreira, M.T., Rivaes, R., Pinheiro, P., 2009. Tipologia de Albufeiras Portuguesas. *In: Qualidade Ecológica e Gestão Integrada de Albufeiras*. Instituto Nacional da Água.
- Fidalgo, M.L., 1990. About the Relationship between some Bacteriological Parameters and other Ecological Factors in Crestuma/Lever Reservoir (River Douro, Portugal). Publicações do Instituto Zoologia Dr. Augusto Nobre. Monografia apresentada a Faculdade de Ciências. Universidade do Porto.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom.
- Flohr, L., Brentano, D. M., Carvalho-Pinto, C. R. S., Machado, V. G., Matias, W. G., 2005. Classificação de Resíduos Sólidos Industriais com base em testes ecotoxicológicos utilizando *Daphnia magna*: uma alternativa. *Biotemas* **18 (2)**:7-18.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., Seaman, M.N.L., Garrigues, P., 2002. Relationships between contaminant levels in Marine sediments and their biological effects on embryos of oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21(11)**: 2310-2318.
- Hart, D.D e Poff, N.L., 2002. A Special Section on Dam Removal and River Restoration. *BioScience* **52 (8)**: 653-655.
- Häder, D.P., Kumar, H.D., Smith R.C., Worrest, R.C., 1998. Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **46 (1-3)**: 53-68. Elsevier.
- INAG, 2004. Instituto da Água - Plano de Ordenamento da Albufeira de Crestuma-Lever, Vol.2. Caracterização da Área de Intervenção. Quatenaire Portugal. Instituto da Água. Programa Ambiente. Projecto Co-Financiado pelo FEDER.
- INAG, 2005. Instituto da Água - Relatório Síntese sobre a Caracterização das Regiões Hidrográficas prevista na Directiva-Quadro da Água.
- INAG, 2009. Instituto da Água - Critérios para a Classificação do Estado das Massas de Água Superficiais.

- ISO, 1996. Water Quality: Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute Toxicity test. ISO International Standard 10706. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- ISO, 2000. Water Quality: Determination of the Inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute Toxicity test. ISO International Standard 6341. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Jager, T., Heugens, E.H.W., Kooijman, S.A.L.M., 2006. Making sense of ecotoxicological test results: towards application of process-based models. *Ecotoxicology* **15**: 305-314. Springer.
- Johnson, B. T., 2005. Microtox Acute Toxicity Test. In: *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations* **1**: 69-105. Blaise, C. and Férard, J-F. Springer.
- Jonczyc, E. e Gilron, G., 2005. Acute and Chronic Toxicity Testing with *Daphnia* sp. In: *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations* **1**: 337-393. C. Blaise and J.-F. Férard. Springer. Netherlands.
- Jorgensen, S.E., 2000. Principles of Pollution Abatement. Pollution Abatement for the 21st century. Elsevier Science.
- Justino, C.I., Duarte, K., Loureiro, F., Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S.,M., Gonçalves, F., Rocha-Santos, T.A.P., Freitas, A.C., 2009. Toxicity and organic content characterization of olive oil mil wastewater undergoing a sequential treatment with fungi photo-Fenton oxidation. *Journal of Hazardous Materials* **172(2-3)**:1560-1572. Elsevier.
- Koivisto, S., Ketola, M., Walls, M., 1992. Comparision of five cladoceran species in short and long-term cooper exposure. *Hydrobiologia* **248**:125-136. Kluwer Academic Printers. Belgium.
- Lei nº 58/2005, de 29 de Dezembro. Lei da Água. *Diário da República* n°249/05 – I Série-A. Assembléia da República. Lisboa.
- Lopes, M.M.T.S, 2002. Avaliação da Qualidade da Água da Albufeira de Crestuma. Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências para a obtenção do grau de Mestre em Hidrobiologia. Departamento de Zoologia e Antropologia. Universidade do Porto.
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll a and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* **12**:343-346.
- Manahan, S.E., 2013. Química Ambiental. 9ªEd. Bookman.



- Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I., 1999. Sediment Toxicity Bioassays for Assessment of Contaminant Sites in the Nervion River (Northern Spain). 1. Three-Brood Sediment Chronic Bioassay of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology* **8**: 97-109.
- Mazzia, C., Capowiez, Y., Sanchez-Hernandez, J.C., Köhler, H.R., Triebkorn, R., Rault, M., 2011. Acetylcholinesterase activity in the terrestrial snail *Xeropicta derbentina* transplanted in apple orchards with different pesticide management strategies. *Environmental Pollution* **159**: 319-323.
- Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L., Boyce, M.S., 1986. Estimating Uncertainty in Population Growth Rates: JackKnife vs. Bootstrap Techniques. *Ecology* **67(5)**: 1156-1166.
- Mendes, B., Oliveira, J.F.S., 2004. Qualidade da Água para Consumo Humano. Editora LIDEL. Portugal.
- MIEB, 2007/2008. Protocolo de Análises físico-químicas de matéria orgânica. Carência Química de Oxigénio e Carência Bioquímica de Oxigénio. Laboratórios de Tecnologias Ambientais. Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal.
- OCDE, 1998. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia magna* Reproduction Test. N°211. Adoptado em 21 de Setembro 1998.
- OCDE, 2004. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia* sp., Acute Immobilization Test. Adoptado em 13 de Abril de 2004.
- Oliveira, J.F.S., 2005. Gestão Ambiental. Editora LIDEL. Portugal.
- Pereira, L.A.M. e Rodrigues, M.A.R., 2005. Avaliação do Estado Trófico das águas nas albufeiras da região de Lisboa e Vale do Tejo. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional de Lisboa e Vale do Tejo.
- Pereira, R., Antunes, S.C., Gonçalves, A.M.M., Marques, S.M., Gonçalves, F., Ferreira, F., Freitas, A.C., Rocha-Santos, T.A.P., Diniz, M.S., Castro, L., Peres, I., Duarte, A. C., 2009. The effectiveness of a biological treatment with *Rhizopus oryzae* and of a photo-Fenton oxidation in the mitigation of toxicity of a bleached kraft pulp mill effluent. *Water Research* **43**: 2471-2480.
- Podemski, C.L., Culp, J.M., 2001. Toxicant Interactions with Food Algae: A Missing Link Between Laboratory and Field Effects. *Environmental Toxicology* **16(1)**: 31-42.

- Poff, N.L., Allan, J.D., Bain, M.B., Karr, J.R., Prestegard, Richter, B.D., Sparks, R.E., Stromberg, J.C., 1997. The natural flow regime. *BioScience* **47**: 769-784.
- Postel, S., 1992. *In: The Last Oasis: Facing Water Scarcity*. W W Norton & Company Incorporated.
- Postel, S., 2000. Troubled Waters. *In: Essays & Comment*. The Sciences. pp 19 - 24.
- Poston, T.M., Hanf, R.W. Jr., Simmons, M.A. 1984. Toxicity of Uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution* **22**: 289-298. D. Reidel Publishing Company.
- Raymond, C.M., Fazey, I., Reed, M.S., Stringer, L.C., Robinson, G.M., Evely, A.C., 2010. Integrating local and scientific knowledge for environmental management. *Journal of Environmental Management* **91**: 1766-1777. Elsevier.
- Regulamento nº 793/93/CEE de 23 de Março. *Jornal Oficial da União Européia* nº L 084 de 05/04/1993. p.0001-0075.
- Reynolds, C.S., 1992. Eutrophication and the management of planktonic algae: what Volleinwaider couldn't tell us. *In: Eutrophication: research and application to water supply*. D.W. Sutcliffe & J.G. Jones (eds). Freshwater Biological Association, Ambleside: 4-29.
- Ribeiro, C., Tiritan M.E., Rocha, E., Rocha, M.J., 2009. Seasonal and spatial distribution of endocrine-disrupting compounds on the Douro river estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **56**: 1-11. Springer.
- Santos, N.C.R., 2013. Avaliação do Estado Trófico da Albufeira do Sordo. Dissertação apresentada à Universidade do Porto para obtenção de grau de Mestre em Biologia e Gestão da Qualidade da Água. Departamento de Biologia. Universidade de Porto. Portugal.
- Semaan, M., Holdway, D.A., van Dam, R.A., 2001. Comparative Sensitivity of Three Populations of the cladoceran *Moinodaphnia macleayi* to Acute and Chronic Uranium Exposure. *Environmental Toxicology* **16(5)**: 365-376
- Sibley, P.K., Legler, J., Dixom, D.G., Barton, D.R., 1997. Environmental health assessment of the benthic habitat adjacent to a pulp mill discharge. I. Acute and chronic toxicity of sediments to benthic macroinvertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **32**: 274-284.

- Stark, J.D, Tanigoshi, L., Bounfour, M., Antonelli, A., 1997. Reproductive Potencial: Its influence on the susceptibility of a species to pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **37(3)**:273-279. Elsevier.
- Stein, Jr., 1973. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, United Kingdom, pp 7-24.
- Stokols, D., 1992. Establishing and maintaining healthy environments: toward a social ecology of health promotion. *American Psychologist Association* **41 (1)**: 6-22.
- Sucker, C. e Krause, K., 2010. Increasing dissolved organic carbon concentrations in freshwaters: what is the atual driver? *i Forest – Biogeosciences and Forestry* **3**: 106-108.
- Taylor, G., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., 1998. Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17(3)**:412-419.
- Tebbutt, T.H.Y., 1998. Principles of Water Quality Control. 5<sup>th</sup> Edition. Butterworth-Heinemann. Elsevier Science.
- Tempesta, T. e Vecchiato, D., 2013. Riverscape and Groundwater Preservation: A Choice Experiment. *Environmental Management*. Springer Science+Business Media. New York.
- Tharme, R.E., 2003. A Global Perspective on Environmental Flow Assessment: Emerging Trends in the Development and Aplication of Environmental Flow Methodologies for Rivers. *River Research and Applications* **19**: 397-441.
- Tibbets, J., 2000. Water World 2000. *Environmental Health Perspectives* **108 (2)**.
- Trancoso, M.A., Cruz, M.J., Salgueiro, P., Caldeira, Z., 2001. Chemical monitoring and evaluation of the water quality of the Douro River at Crestuma-Lever dam. *Journal of Environmental Monitoring* **4 (3)**: 382-285.
- Travassos, N.L.M., 2013. A gestão dos recursos hídricos frente aos desafios de efectivação da legislação ambiental: uma abordagem comparativa entre Portugal e Brasil. Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências para obtenção de mestre em Ciências e Tecnologia do Ambiente. Faculdade de Ciências. Universidade do Porto. Portugal.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C. L., 2003. Microbiology: An Introduction. 8<sup>th</sup> Edition. Benjamin Cummings.

- USEPA and USACE, 1998. Great Lakes Dredged Material Testing and Evaluation Manual. Appendix G, p. 242.
- Vasconcelos, V.M., 1993. Toxicity of cyanobacteria in lakes of North and Central Portugal. Ecological Implications. Verh International Verein. *Limnology* **25**: 694-697.
- Vasconcelos, V.M., 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **32(3)**:249-254.
- Vasconcelos, V., 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystem cry for help. *Limnetica* **25(1-2)**: 425-432. Asociación Española de Limnología, Madrid, Spain.
- Verdum, R., e Medeiros, R.M.V., 2006. Rima – Relatório de Impacto Ambiental: Legislação, elaboração e resultados. 5<sup>th</sup> Edição. Editora UFRGS. Porto Alegre. RS/Brasil.
- Villarroel, M.J, Sancho E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide on *Daphnia magna*. *Chemosphere* **53**: 857-864. Elsevier.
- Watkinson, A.J., Murby, E.J., Costanzo, S.D., 2007. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research* **41**: 4164-4176.
- Wetzel, R.G., 1983. Limnology. 2.nd Edition. Saunders College Publishing. U.S.A
- WHO, 2005. World Health Organization. *Millennium Ecosystem Assessment Report*. Ecosystems and Human Well-Being. Health Synthesis.
- Williamson C.E., Morris D.P., Pace M.L., Olson O.G., 1999. Dissolved organic carbon and nutrients as regulators of lake ecosystems: resurrection of a more integrated paradigm. *Limnology and Oceanography* **44**:795-803

## WEBGRAFIA

- Aguirre, M. C., 2002. A participação social na gestão ambiental: percepções sobre algumas experiências amazónicas. Ministério das Relações Exteriores. Domínio Público. Acedido em: 1, Julho, 2013, em [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=86908](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=86908)
- Cetesb, 2013. Águas Superficiais. Variáveis da qualidade das águas. Acedido em 18, setembro, 2013, em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/%C3%81guas-Superficiais/34-Vari%C3%A1veis-de-Qualidade-das-%C3%81guas>
- FAO, 1999. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Pressure, State, Response: Environmental Indicators*. Acedido em 28, agosto, 2013, em: <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/pt/lead/toolbox/Refer/EnvIndi.htm>
- Goulart e Calisto, 2003. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. Acedido em 18, agosto, 2013, em: <http://apostilas.cena.usp.br/Valdemar/CEN0413%20-%20Agrot%C3%B3xicos%20-%20Intera%C3%A7%C3%B5es%20no%20Ambiente/bioindicadores%2019.10.2010.pdf>
- Leitão, R.M., 2005. A Hidroelectricidade na Bacia Portuguesa do Rio Douro – Situação e Perspectivas de Desenvolvimento. EDP – Gestão da Produção de Energia S.A. Acedido em 03, julho, 2013, em: <http://www.unizar.es/fnca/duero/docu/p213c.pdf>
- Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos. Acedido em 10, setembro, 2013, em: <http://snirh.pt/index.php?idRef=MTM4Ng==&findestacao=crestuma>